

RENATA PEREIRA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA
DE UM FATOR PROCOAGULANTE DO
VENENO DE *Lonomia obliqua***

CAMPINAS

2006

RENATA PEREIRA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA
DE UM FATOR PROCOAGULANTE DO
VENENO DE *Lonomia obliqua***

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do título de
Doutor em Farmacologia.*

Orientador: Prof. Dr. Gilberto de Nucci

CAMPINAS

2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

P414p Pereira, Renata
Purificação e caracterização bioquímica de um fator procoagulante
do veneno de *Lonomia obliqua* / Renata Pereira. Campinas, SP :
[s.n.], 2007.

Orientador : Gilberto Di Nucci
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Sangue - coagulação. 2. Envenamento. 3. Lagarta. 4.
Lepidóptero. I. Nucci , Gilberto Di. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : Purification and biochemistry characterization of a
procoagulant factor of *Lonomia oblique* venom**

Keywords: • Blood coagulation

- Envenoming
- Caterpillar
- Lepidoptera

Titulação: Doutorado em Farmacologia

Banca examinadora: Prof Dr Gilberto Di Nucci

Prof Dr Sérgio Marangoni

Profa. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi

Profa. Dra. Soraia Kátia Pereira Costa

Prof Dr José Carlo Cogo

Data da defesa: 19-12-2007



Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador:

Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Membros:

Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Prof. Dr. Sérgio Marangoni

Profa. Dra. Joyce Maria Annichino Bizzacchi

Profa. Dra. Soraia Kátia Pereira Costa

Prof. Dr. José Carlos Cogo

**Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 19/12/2006

DEDICATÓRIA

A meus pais, Vera Lúcia e Braz, e a meus padrinhos, Áurea e Raimundo, por toda dedicação e por tornarem possível minha trajetória até aqui.

Ao Otávio Alexandre, pelo incentivo e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Gilberto de Nucci, pela oportunidade de realização deste trabalho e sua orientação.

AGRADECIMENTOS

Aos pesquisadores, estudantes e funcionários do Departamento de Farmacologia da FCM pela colaboração, apoio e amizade.

Ao Prof Irineu Lorini e Profa Lisete Lorini e à EMBRAPA (Passo Fundo/RS), pelo apoio e fornecimento das lagartas, para o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra Francini Rendu e Dr Bernard Le Bonniec, do Laboratório de Hemostasia, da Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Paris V, Paris, France, por me receberem e pelo auxílio na condução deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro ao projeto.

	<i>Pág.</i>
RESUMO.....	<i>xii</i>
ABSTRACT.....	<i>xiv</i>
1- INTRODUÇÃO GERAL.....	16
1.1- Acidentes causados por lepidópteros.....	17
1.2- Ciclo biológico da Lonomia obliqua.....	18
1.3- Toxinologia do gênero Lonomia.....	21
1.3.1- Mecanismo de ação do veneno.....	21
1.3.2- Quadro clínico do envenenamento.....	23
1.3.3- Tratamento do envenenamento.....	26
1.4- Coagulação sanguínea e atuação do veneno.....	29
1.5- Bioquímica do fator X.....	31
2- OBJETIVO GERAL.....	34
3- TRABALHO PUBLICADO.....	36
4- CONCLUSÃO E DISCUSSÃO GERAIS.....	46
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

Arg	Arginina (aminoácido)
Asp	Asparagina (aminoácido)
Da	Daltons (unidade de massa)
DE-50%	Dose efetiva
DI-50%	Dose indutiva
EACA	Ácido épsilon-amino-capróico
EGF	Fator de crescimento epidermal (“Epidermic growth factor”)
FPA	Fibrinopeptídeo parte A
FPB	Fibrinopeptídeo parte B
Gla	Ácido glutâmico (aminoácido)
Gly	Glicina (aminoácido)
His	Histidina (aminoácido)
IgG	Imunoglobulina G
Ile	Isoleucina (aminoácido)
IRA	Insuficiência renal aguda
K	Potássio
kDa	Kilo Daltons (unidade de massa)
LOPAP	Protease de Lonomia obliqua ativadora de protrombina (“Lonomia obliqua prothrombin activator protease”)
Lys	Lisina (aminoácido)
mL	Mililitros
Mr	Massa relativa

PL	fosfolípides
RS	Rio Grande do Sul
RVV	Veneno de <i>Vipera russelli</i> (“ <i>Vipera russelli</i> venom”)
Ser	Serina (aminoácido)
TF	Fator tecidual
TP	Tempo de protrombina
TT	Tempo de trombina
TTP	Tempo de tromboplastina parcial

LISTA DE TABELA

	<i>Pág.</i>
Tabela 1.....	22

LISTA DE FIGURAS

	<i>Pág.</i>
Figura 1- Ciclo biológico da <i>Lonomia obliqua</i>	20
Figura 2- Sinais do envenenamento.....	25
Figura 3- Cascata de coagulação sanguínea e locais de ação do veneno de <i>L. obliqua</i> e <i>L. achelous</i>	31

Este trabalho foi desenvolvido no Departamento de farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade estadual de Campinas (Unicamp) e parte das atividades foram realizadas no laboratório de Hemostasia da Faculdade Farmácia de Paris V (Paris, França).

As lagartas foram gentilmente coletadas e cedidas pela EMBRAPA de Passo Fundo (RS), pelo Prof Irineu Lorini e Profa Lisete Lorini..

A tese é apresentada com o artigo originado do trabalho publicado, sendo composta por: Resumo, Abstract, Introdução, Objetivo do trabalho, Trabalho Publicado, Conclusão e Discussão e Referências Bibliográficas.



RESUMO

Desde 1986 acidentes causados pelo contato com lagartas de mariposas da espécie *Lonomia obliqua* vêm sendo notificados na Região Sul do Brasil. O envenenamento humano por esta espécie resulta em alterações do sistema de coagulação, caracterizando um quadro de coagulação intravascular disseminada, associado a uma síndrome fibrinolítica severa.

Estudos demonstraram que o veneno da *Lonomia obliqua* contém um ativador de fator X e um ativador de protrombina. Uma proteína ativadora de protrombina, denominada LOPAP (“*Lonomia obliqua* prothrombin activator protease”) foi isolada e caracterizada bioquímica e fisiologicamente. Esta enzima é uma serino protease de 69 kDa. Quando testada *in vivo*, a LOPAP leva à formação de microcoágulos, hemorragia microvascular e pulmonar, sangue incoagulável e uma infiltração leucocitária pulmonar em ratos.

Neste trabalho, através de cromatografia de exclusão, seguida por cromatografia de fase reversa (HPLC) isolou-se uma proteína de 20745.7 Da do extrato de cerdas de *L. obliqua*. Durante o processo, foi avaliada a atividade ativadora de fator X humano purificado *in vitro*, através de ensaio de cinética enzimática com o uso de substratos cromogênicos. A proteína ativa isolada apresentou imunorreatividade com o soro-antilonômico, produzido pelo Instituto Butantan. Com o uso de técnicas aplicadas a proteômica, determinou-se a sequência de aminoácidos da proteína com atividade tipo fator Xa. Trata-se de uma proteína nova, ainda não sequenciada, a qual apresenta grande identidade com proteínas da família das lipocalinas.

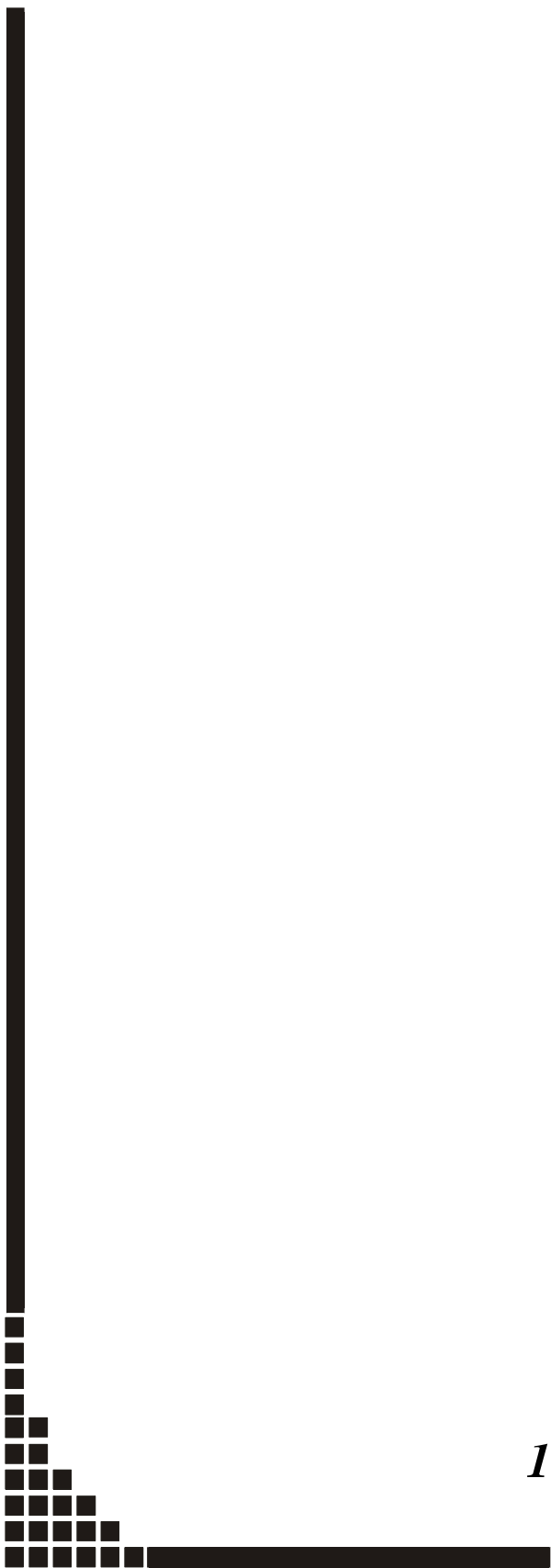


ABSTRACT

Since 1986 accidents caused by contact with caterpillars of butterflies of the *Lonomia obliqua* species comes being notified in the South Region of Brazil. The human envenoming for this species results in alterations of the coagulation system, characterizing a disseminated intravascular coagulation, associated to a severe fibrinolytic syndrome.

Studies had demonstrated that the venom of the *Lonomia obliqua* contains a factor X and a prothrombin activator. An activator protein of prothrombin, called LOPAP (“*Lonomia obliqua* prothrombin activator protease”) was isolated and biochemist and physiologically characterized. This enzyme is a serine protease of 69 kDa. When tested *in vivo*, the LOPAP leads to thrombus formation, microvascular and pulmonary hemorrhage, unclottable blood and leukocyte infiltration in the lungs at rats.

In this work, through chromatography of exclusion, followed by phase reverse chromatography (HPLC), it was isolated a 20745.7 Da protein of the spicules extract of *L. obliqua*. During the process, it was evaluated the purified human factor X activator activity *in vitro*, through kinetic assay with the chromogenic substrate use. The isolated protein presented factor Xa like activity and presented immunoreactivity with the antilonomic serum, produced by Butantan Institute. Using techniques applied to the proteomic studies, it was determined the amino acid sequence of the protein with factor Xa like activity. It is a new protein, not yet sequenced, which has large identity with lipocalins family protein.



1- INTRODUÇÃO GERAL

A incidência de acidentes causados por insetos não é conhecida, embora a hipersensibilidade provocada pela picada de himenópteros (abelhas, vespas e formigas) seja de grande importância médica. Da mesma forma, não há dados precisos sobre a incidência e o real dimensionamento de acidentes causados por lepidópteros (mariposas e borboletas), embora se tenha conhecimento da existência de mais de duzentas espécies irritativas de lepidópteros (Brasil, 1998).

1.1- Acidentes causados por lepidópteros

Dentre os artrópodes, encontra-se uma diversidade de animais portadores de toxinas prejudiciais ao homem, inclusive na classe Insecta. A ordem Lepidoptera (borboletas e mariposas) representa um desses grupos. Mais de 60 gêneros de taturanas capazes de causar acidentes em humanos têm sido descritos, e são divididos entre as subordens Rhopalocera (borboletas) e Heterocera (mariposas). Nesta última encontra-se a família Saturniidae, cujos membros são encontradas no mundo inteiro. Na família Saturniidae, o gênero *Lonomia*, principalmente as espécies *Lonomia achelous* (Cramer) e *Lonomia obliqua* (Walker), é conhecido como causador de acidentes graves em humanos. Cerca de 1000 casos foram relatados em diferentes países da América do Sul, incluindo Argentina, Brasil, Guiana Francesa, Paraguai, Peru e Venezuela (Arocha-Piñango e Guerrero, 2000).

O gênero *Lonomia* é identificado como responsável por alterações hemorrágicas na década de 1970 por Lemaire (Lemaire, 1972a,b). A captura de lagartas responsáveis por acidentes hemorrágicos na Venezuela (Arocha-Piñango, 1967; Arocha-Piñango, Layrisse, 1969) permitiu a identificação e caracterização desses animais como *Lonomia achelolous* (Cramer).

Casos semelhantes aos ocorridos na Venezuela são relatados no sudeste do Estado do Amapá e noroeste da Ilha de Marajó, no Pará (Fraiha et al., 1986). Levantamento retrospectivo de casos e óbitos levou à detecção de 26 acidentes hemorrágicos, num período de cinco anos, e 12 óbitos, sugerindo os autores uma letalidade superior a 38%.

A partir de larvas coletadas em áreas de acidente, foi realizada a identificação específica de exemplar adulto macho, revelando tratar-se de *Lonomia achelous*, a mesma espécie encontrada na Venezuela.

Em 1989, acidentes semelhantes passaram a ocorrer na Região Sul do país, no norte do Rio Grande do Sul e oeste de Santa Catarina. Nesta ocasião pouco se conhecia acerca das propriedades farmacológicas do veneno de *Lonomia*, sobre as características de seu ciclo de vida e sobre os aspectos clínicos conseqüentes ao contato com suas cerdas. O conhecimento disponível sobre o gênero *Lonomia* baseava-se principalmente nos estudos realizados na Venezuela, com a espécie *L. achelous* (Arocha-Piñango, 1967; Arocha-Piñango e Layrisse, 1969; Arocha-Piñango et al., 1988).

As lagartas responsáveis pelos acidentes nos estados de Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná foram classificadas por Lemaire como *Lonomia obliqua* (Walker) e somente em 1995, é apresentada uma revisão sobre os principais aspectos clínicos do quadro hemorrágico causado pela inoculação do veneno de *L. obliqua*, além de estudos *in vitro* e *in vivo* utilizando hemolinfa e extratos de cerdas (Kelen et al., 1995).

1.2- Ciclo biológico da *Lonomia obliqua*

O ciclo biológico da *L. obliqua* é composto por quatro fases distintas: ovo (fase embrionária), larva, pupa e adulta (mariposa), sendo a fase larval a única a apresentar perigo de causar envenenamento (Lorini e Corseuil, 2001).

Os fatores externos como nutrição, temperatura, criação, parasitismo e sexo, aliados às variações individuais de cada espécime, influenciam nas alterações de duração, quantidades de instares (estágios de crescimento da fase larval), coloração e tamanho das larvas.

A fase embrionária corresponde a um período de aproximadamente 30 dias que se encerra com a eclosão dos ovos, os quais são uniformes e de cor verde claro. Durante a fase de larva, que dura em média 60 dias, ocorrem seis instares.

As lagartas de *L. obliqua* são polífagas, possuem comportamento gregário desde a eclosão até a fase de pré-pupa. Geralmente ficam agrupadas nos troncos de árvores durante o dia, saindo à noite para se alimentarem das copas. São encontradas freqüentemente em árvores frutíferas comestíveis e nativas.

O hábito das lagartas, de se reunirem em colônias nos troncos (aproximadamente um metro do solo) durante o dia, facilita o contato e a ocorrência de acidentes em humanos. O acidente ocorre pelo contato da pele humana com as cerdas das lagartas. Estas cerdas desenvolvem-se a partir de células tricógenas (células formadoras do pêlo), diferenciadas de células da epiderme.

Antes de formarem a pupa, elas entram em uma fase de pré-pupa, onde param de se alimentar e se isolam embaixo dos restos vegetais ao redor do tronco da árvore hospedeira, para eliminar sua exúvia. As pupas têm cor castanho-avermelhada e duram em média 70 dias.

Na fase adulta, as mariposas mostram dimorfismo sexual na cor, tamanho e no tipo de antena. Os machos geralmente possuem um tamanho médio de 60 mm de envergadura e com as antenas bipectinadas. A face dorsal das quatro asas é de cor amarela forte, muitas vezes com mudança em tom rosado. As fêmeas possuem um tamanho médio de 80 mm e com as antenas filiformes (Lorini, 1999). A face dorsal das asas é de tonalidade castanho-acinzentada, geralmente com nuances cinzento rosadas. A figura 1 mostra exemplares do ciclo biológico da *L. obliqua*.

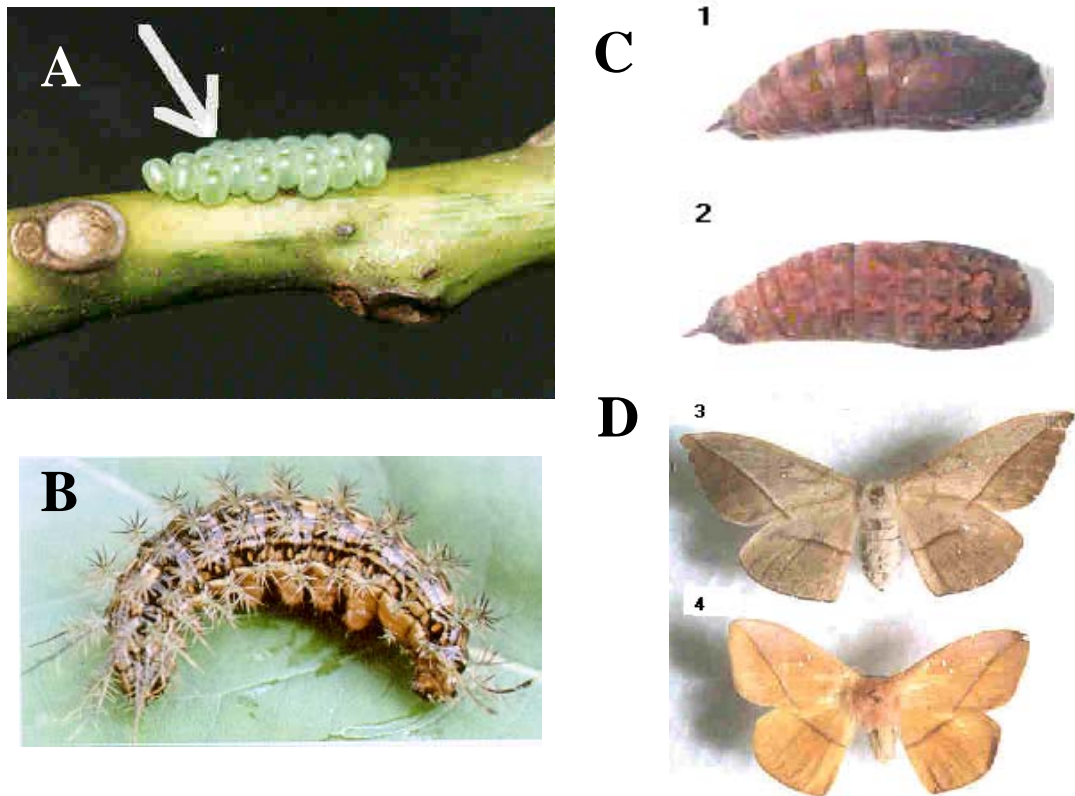


Figura 1- Ciclo biológico da *Lonomia obliqua*. Ovos (A), lagarta (B), pupa macho (C1) e fêmea (C2), mariposa fêmea (D3) e macho (D4)

Atribui-se à derrubada de matas nativas em várias regiões do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, a migração de *L. obliqua* para a região rural, aumentando assim o número de acidentes por contato com as lagartas. Além do desmatamento, a expansão agrícola com o uso desmedido de agrotóxicos, talvez tenha levado à diminuição dos predadores naturais e, conseqüentemente, a uma expansão da espécie em ambientes mais próximos ao homem.

1.3- Toxinologia do gênero *Lonomia*

1.3.1- Mecanismo de ação do veneno

Até a ocorrência dos primeiros acidentes no Sul do país, estudos bioquímicos e farmacológicos sobre a composição do veneno de *Lonomia* e seus mecanismos fisiopatológicos eram disponíveis somente para a espécie *L. achelous*.

O acidente com *L. achelous* afeta os mecanismos de coagulação e fibrinólise do sangue, resultando na diminuição drástica de fibrinogênio, fator V, fator VIII, plasminogênio e α_2 -antiplasmina e da atividade da proteína C, um inibidor natural da coagulação. Concomitantemente há o aumento do nível plasmático de fator de von Willebrand, fator VIII e produtos de degradação de fibrinogênio e de fibrina. Estas ações indicam uma coagulopatia de consumo intensa associado à ativação da fibrinólise (Arocha-Piñango e Guerrero, 2000; Arocha-Piñango e Guerrero, 2001).

A atividade coagulante do veneno de *L. achelous* se dá pela ativação do fator X (Arocha-Piñango e Pepper, 1981) e da protrombina (Guerrero e Arocha-Piñango, 1992), enquanto a sua atividade anticoagulante deve-se à degradação do fator XIII (Guerrero et al., 1997a,b), à hidrólise generalizada do fibrinogênio (Arocha-Piñango et al., 1981), e à uma potente atividade fibrinolítica (Arocha-Piñango, 1967; Arocha-Piñango, 1973; Arocha-Piñango e Pepper, 1981). Duas isoformas da enzima responsável por esta última atividade (Achelase I e II) foram purificadas e caracterizadas (Amarant et al., 1991). Estas duas proteínas, com peso molecular de 22.4 e 22.7 kDa, degradam fibrina com uma preferência para a cadeia $\alpha > \beta \gg \gamma$, produzindo assim fragmentos de peptídeos muito semelhantes aos produzidos pela ação da tripsina.

Estudos *in vitro* demonstraram que o extrato de cerdas de *L. obliqua* não possui atividade do tipo trombina, mas é capaz de iniciar a coagulação através da ativação do fator X e da protrombina, sendo esta última dependente de cálcio (Donato et al., 1998). Atividades semelhantes foram relatadas para *L. achelous* (Arocha-Piñango e Pepper, 1981; Guerrero e Arocha-Piñango, 1992).

Uma proteína ativadora da protrombina, denominada LOPAP (“*Lonomia obliqua* prothrombin activator protease”), foi isolada do extrato de cerdas e caracterizada bioquímica e fisiologicamente (Reia et al., 2001a,b). Esta enzima é uma serino protease de cadeia única, de 69 kDa, cuja atividade enzimática é potencializada pelo cálcio. A determinação da sequência parcial dos amino ácidos da região N-terminal mostra que há pouca identidade com outros ativadores de protrombina (Reis et al., 2001a). Testes *in vivo* demonstram que a LOPAP induz a formação de trombos, hemorragia microvascular e pulmonar, não coagulação do sangue e uma infiltração leucocitária pulmonar em ratos (Reis et al., 2001b).

A Tabela 1 mostra os componentes do veneno de *Lonomia sp* capazes de atuar na coagulação.

Tabela 1- Principais proteínas identificadas em extratos de cerdas e hemolinfa de espécies de *Lonomia*.

Espécie	Nome da proteína	Atividade
<i>Lonomia achelous</i>	Lonomina II (achelases I e II)	Atividade tipo plasmina
	Lonomina III	Ativador da protrombina
	Lonomina IV	Atividade tipo Fator Xa
	Lonomina V	Proteólise do Fator XIII
		Atividade tipo uroquinase
	Lonomina VI:a	Ativador de Fator V
	Lonomina VI:i	Inibidor de Fator V
	Lonomina VII	Atividade tipo calicreína
<i>Lonomia obliqua</i>	LOPAP	Ativador da protrombina
	(Não reportado)	Ativador do Fator X
	Lonomiatoxina	Atividade tipo fosfolipase A ₂

Fonte: Arocha-Piñango e Guerrero (2000).

1.3.2- Quadro clínico do envenenamento

Os acidentes com *Lonomia* ocorrem através do contato das lagartas com a pele da vítima. Neste contato, as cerdas da lagarta penetram na pele, sendo inoculado o veneno.

As manifestações locais iniciam-se com dor como queimadura, edema, hiperemia, prurido e adenopatia regional. Lesões eritematosas podem ocorrer, em função do contato com as cerdas.

Evidências da presença de alterações sistêmicas provocadas pelo veneno de lepidópteros foram descritas por Alvarenga em 1912¹. No entanto, somente na década de 1960 com as primeiras descrições de envenenamento com *L. achelous*, chamou-se a atenção para a presença de manifestações em locais distantes do sítio de contato, caracterizadas por sangramentos espontâneos ou provocados, de intensidade variável, porém potencialmente responsáveis por casos graves.

O contato com larvas de *L. achelous* causa dor e sensação de calor no local do contato, muitas vezes seguido de cefaléia, dores generalizadas, mal estar e febre. Entre duas e 72 horas após o contato, foi verificado o aparecimento de hematomas e sangramentos, sendo caracterizados por epistaxes, otorragia, enterorragia, metrorragia e equimoses generalizadas.

Distúrbios na coagulação sanguínea foram detectados por meio do tempo de coagulação, da atividade de protrombina, tempo de trombina e dosagem de fibrinogênio plasmático por até 20 dias após o contato com as lagartas (Arocha-Piñango, 1967; Arocha-Piñango e Layrisse, 1969). Os pacientes geralmente mostram um número de plaquetas normal, mas baixos níveis de fibrinogênio e tempos muito prolongados de TP (tempo de protrombina), TTP (tempo de tromboplastina parcial) e TT (tempo de trombina).

A intensidade das alterações no sistema de coagulação e a gravidade dos acidentes por *L. achelous* foi confirmada por Fraiha et al. (1986) no Brasil. No Amapá e Ilha de Marajó, no Pará, em locais de plantação de seringueiras de várzea, foram

¹ Alvarenga 1912 *apud* Kelen EMA, Picarelli ZP, Duarte AC. Hemorrhagic syndrome induced by contact with caterpillar of the genus *Lonomia* (Saturnidae, Hemileucinae). J Toxinol Toxin Rev 1995; 14(3): 283-308.

registrados 26 casos em um período de cinco anos, com 12 óbitos. O quadro hemorrágico de natureza sistêmica foi composto por hematomas, hemorragia gengival, uterina, de leito ungueal, hematúria, epistaxe, hematêmese e melena, após o contato com lagartas de *L. achelous*.

Foi relatado por Arocha-Piñango et al. (1988) a evolução fatal por hemorragia cerebral difusa, cuja necropsia evidenciava ainda a presença de sangue na cavidade renal e peritoneal.

Em 1989, complicações renais motivaram a internação dos primeiros casos descritos no Rio Grande de Sul (Duarte et al., 1990). Um dos pacientes havia sido admitido em anúria, com diagnóstico de insuficiência renal aguda (IRA), enquanto outro apresentava hematúria franca e choque hipovolêmico, tendo posteriormente evoluído com IRA. Ambos os pacientes haviam tido contato com lagartas, orugas, nome popular na Região Sul do país.

O número de casos registrados na Região Sul do Brasil superou a casuística da Venezuela. Em quatro anos, 33 acidentes foram descritos no Rio Grande do Sul, com evolução para insuficiência renal aguda em seis pacientes. A gravidade desses acidentes também ficou evidenciada com o registro de quatro óbitos, um por hemorragia pulmonar maciça e três por hemorragia intracraniana (Duarte et al., 1996).

No período de dezembro de 1989 a fevereiro de 1994, 155 pacientes haviam sido admitidos no Hospital São Vicente de Paulo, em Passo Fundo, Rio Grande do Sul, com diagnóstico de acidente lonômico (Kelen et al., 1995). Da mesma forma que os casos observados na Venezuela e na Região Norte do Brasil, a maioria dos pacientes apresentava quadro local inflamatório semelhante a outros lepidópteros conhecidos. Chamava a atenção à ocorrência de mal estar, cefaléia, náuseas e vômitos como manifestações que, muitas vezes, antecederiam ao aparecimento de sangramentos. Os principais sinais do acidente lonômico são apresentados na figura 2.

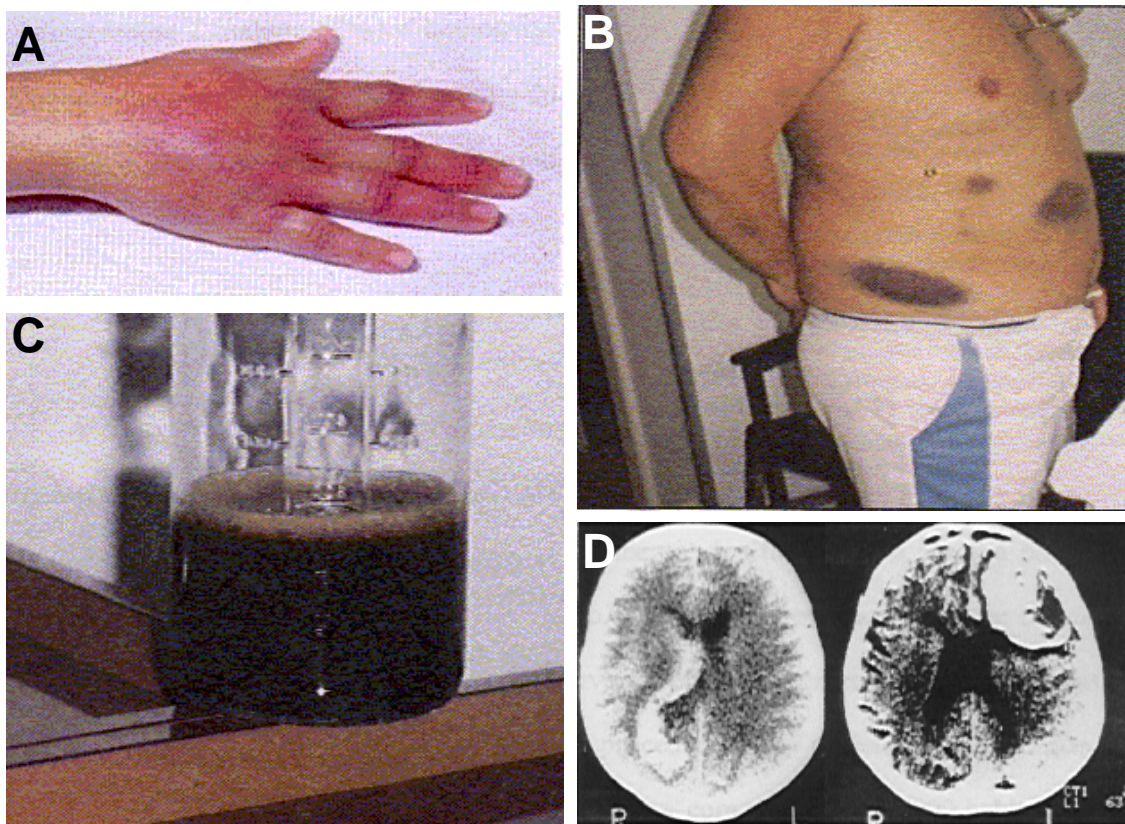


Figura 2- Sinais do envenenamento por *L. obliqua*. **A-** edema, **B-** equimoses espontâneas, **C-** hematúria e **D-** hemorragia intracraniana.

Os aspectos epidemiológicos do acidente lonômico foram analisados por Duarte (1997), a partir da observação de 286 casos, atendidos em Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

De dezembro de 1998 a junho de 2000, 201 pacientes com acidente lonômico foram atendidos na emergência do Hospital Regional de Chapecó, em Santa Catarina. Dentre estes 105 foram incluídos em um estudo de caracterização do efeito do envenenamento por *Lonomia* nos parâmetros do sistema de coagulação do sangue (Zannim et al, 2003).

1.3.3- Tratamento do envenenamento

A reposição de hemácias e a administração de fatores de coagulação e de drogas antifibrinolíticas constituíam as ferramentas disponíveis no controle das alterações hemostáticas até a década de 1980. É referida a recuperação dos pacientes, ainda que o tempo necessário para a normalização da coagulação tivesse sido bastante prolongado (duas a cinco semanas), com a utilização de concentrado de hemácias, prednisona, concentrado de fibrinogênio e antifibrinolíticos (Arocha-Piñango, 1967; Arocha-Piñanga e Layrisse, 1969).

Dentre os antifibrinolíticos, os mais empregados foram aprotinina (Trasylol®) e o ácido épsilon-amino-capróico – EACA (Ipsilon®). Em 1977, Arocha-Piñango et al. mostraram a evolução de dois pacientes que utilizaram aprotinina onde em um deles os níveis de fibrinogênio plasmático permaneceu abaixo de 100 mg até 14 dias após a instituição da terapêutica.

A primeira tentativa de comparação entre os esquemas terapêuticos até então preconizados foi realizada com três grupos de tratamento não aleatorizados e acompanhamento de oito pacientes (Arocha-Piñango et al., 1988). Os resultados dos exames realizados 72 horas após o início do tratamento mostraram que os pacientes que receberam sangue total ou plasma fresco permaneceram com níveis baixos de plaquetas, plasminogênio e fatores de coagulação e aumento muito discreto do fibrinogênio plasmático. Aqueles submetidos ao tratamento com a aprotinina e/ou EACA em adição à terapêutica de reposição e os que receberam fibrinogênio humano, os fenômenos hemorrágicos teriam cessado poucas horas após o tratamento.

O tratamento com reposição de sangue total, plasma e crioprecipitado apresentou exacerbação das manifestações clínicas do envenenamento (Arocha-Piñango et al., 1992).

Ácido amino-capróico

O ácido épsilon-amino-capróico (EACA) é um aminoácido sintético com ação antifibrinolítica que provoca saturação dos sítios de ligação de lisina do plasminogênio, deslocando-o da superfície da fibrina (Mannucci, 1998). No Brasil, recebe o nome comercial de Ipsilon[®] (Nikkho). É prontamente absorvido pelo trato gastrointestinal atingindo, por via oral a concentração plasmática máxima em cerca de duas horas. A distribuição é ampla, tanto no compartimento extravascular, como no intravascular. Com meia-vida de aproximadamente 80 minutos, a maior parte do EACA não é metabolizada, mas excretada na forma ativa pela urina, concentrando-se primariamente no rim por processo de filtração e reabsorção tubular. É indicado no tratamento das hemorragias induzidas por hiperfibrinólise, por agentes trombolíticos, edema angioneurótico hereditário, menorria primária ou induzida; na prevenção de sangramentos excessivos e na redução do uso de hemoderivados em cirurgias de grande porte, de recidivas de hemorragias subaracnóides e, após extração dentária, em hemofílicos (Verstraete, 1985).

Soro antilonômico

Com o aumento dos casos no Sul do Brasil a partir de 1989, a demanda por um tratamento realmente efetivo deu origem à produção do soro antilonômico, a partir de extrato de cerdas de lagartas contendo o veneno inoculado em cavalos (Dias da Silva et al., 1996) e, esquemas de imunização análogos aos demais soros antipeçonhentos (Rocha-Campos et al., 2001).

O único tratamento adequado e eficaz no momento é a administração do soro antilonômico, produzido pelo Instituto Butantan (Brasil, 1998), que tem se mostrado eficaz na reversão da coagulopatia tanto em experimentos com animais (Dias da Silva et al., 1996; Rocha-Campos et al., 2001) como em pacientes envenenados (Fan, 2002; Zannim et al, 2003). O antiveneno é fornecido na forma líquida, em ampolas de 10 mL.

A potência do soro antilonômico foi determinada estimando-se a dose de antiveneno necessária para proteger camundongos contra o efeito da incoagulabilidade sanguínea provocada pelo extrato de cerdas. Assim foram obtidas a dose mínima de extrato

capaz de induzir a não coagulabilidade sanguínea em 50% do grupo (DI-50) e a dose efetiva capaz de reverter a não coagulabilidade em 50% do grupo (DE-50). Os testes de neutralização da ação de toxinas presentes no extrato por anticorpos específicos presentes no soro antilonômico mostraram que as moléculas de IgG eram capazes de inibir *in vitro* o efeito de não coagulabilidade sanguínea provocado pelas doses de extrato de cerdas de 3 DI-50, com uma dose eficaz de 50% do grupo (DE-50) de 38,61 µl e uma potência de 0,29 mg/mL.

Baseado nos relatos de Arocha-Piñango, recomendava-se também o uso do antifibrinolítico ácido épsilon-amino-capróico (EACA) no tratamento destes acidentes (Brasil, 1998). Porém, um estudo clínico recente (Fan, 2002) mostrou claramente que a associação do EACA ao anti-soro não melhora a resposta terapêutica. A quantidade de anti-soro a ser administrada é determinada pela gravidade do acidente, sendo recomendado apenas para os casos moderados e severos (Brasil, 1998; Fan, 2002). A classificação do acidente lonômico no Brasil é realizada de acordo com a gravidade do evento, conforme indicado a seguir:

Grau 0 (leve): pacientes com envenenamento local e sem alteração da coagulação ou sangramento até 24 horas após o acidente confirmado. Não recebem o soro antilonômico.

Grau I (moderado): pacientes com alteração da coagulação e/ou manifestações hemorrágicas em pele e/ou mucosas. Recebem o soro antilonômico (dose recomendada: cinco ampolas de 10 mL cada).

Grau II (severo): pacientes com alteração de coagulação e/ou manifestações hemorrágicas em vísceras. Recebem o soro antilonômico (dose recomendada: 10 ampolas de 10 mL cada).

1.4- Coagulação sanguínea e atuação do veneno

A coagulação se dá em decorrência da transformação do fibrinogênio (fator I) em fibrina insolúvel. O sistema de coagulação consiste em um conjunto de proteínas proteolíticas, proenzimas presentes no plasma que atuam umas sobre as outras, num sistema de cascata. Em cada etapa, o zimógeno de um fator de coagulação sofre uma proteólise limitada e é convertido numa protease ativa. Esta protease é capaz de ativar o fator da coagulação seguinte, até que, afinal, se forme o coágulo sólido de fibrina. O ponto crucial da cascata de coagulação é a ativação da protrombina (fator II) em trombina, sendo esta a protease que atua sobre o fibrinogênio.

O sistema de coagulação é ativado em duas vias: via de deflagração e via de potencialização, as quais eram denominadas via intrínseca e via extrínseca, respectivamente. Na via de deflagração todos os fatores estão presentes na corrente sanguínea, já na via de potencialização tem-se o início da ativação do sistema pela ativação do fator VII a fator VIIa (fator ativado) por atuação de um fator que não está presente no sangue, o fator tecidual (TF), proveniente do subendotélio vascular. Porém, *in vivo*, esta divisão não ocorre, pois o complexo fator tecidual/ fator VIIa é um potente ativador de fator IX e fator X, fazendo a coagulação se desenvolver rapidamente (Colman et al, 1994).

A via de deflagração inclui a ativação do fator XI pelo complexo cininogênio de alto peso molecular (Hka)/ fator XIIa. O fator XIa também converte o fator IX em IXa que por sua vez, associado ao fator VIIIa, PL e íons cálcio formam o complexo tenase, o qual converte fator X em Xa. O fator Xa mais o fator Va, PL e íons cálcio formam o complexo protrombinase, que converte a protrombina (fator II) em trombina (fator IIa). O fator Va atua neste complexo como cofator, possibilitando a formação de receptores para fator Xa na superfície de membranas (Tracey et al., 1981 e 1985; Nesheim et al., 1981).

A trombina é uma proteína multifuncional, atuando em várias etapas da coagulação regulando positivamente ou negativamente o processo. A trombina converte fibrinogênio em fibrina por hidrólise e liberação de fibrinopeptídeos (FPA e FPB); ativa fator XIII (transglutaminase) que estabiliza o coágulo de fibrina por ligações cruzadas; ativa plaqueta, fator V, fator VIII e fator XI. Na presença de trombomodulina inibe o

processo, ativando a proteína C, o melhor anticoagulante natural, que degrada os fatores Va e VIIIa (Mann, 1994; Dibella et al., 1995) impedindo que a reação de coagulação ocorra, já que estas proteínas fazem parte dos complexos protrombinase e tenase respectivamente.

A protrombina pode ser ativada por uma série de fatores exógenos, dentre os quais são encontrados vários ativadores presentes em venenos de serpentes. Os mais conhecidos são a ecarina, proveniente do veneno de *Echis carinatus* e o ativador de fator II do veneno de *Oxyuranus scutellatus* (Rosing e Tans, 1991). O veneno de *L. obliqua* atua na cascata de coagulação ativando o fator X e fator II (Donato et al., 1998; Reis et al, 2001a). Os locais de atuação dos componentes de *L. achelous* e *L. obliqua* na cascata de coagulação são apresentados na figura 3.

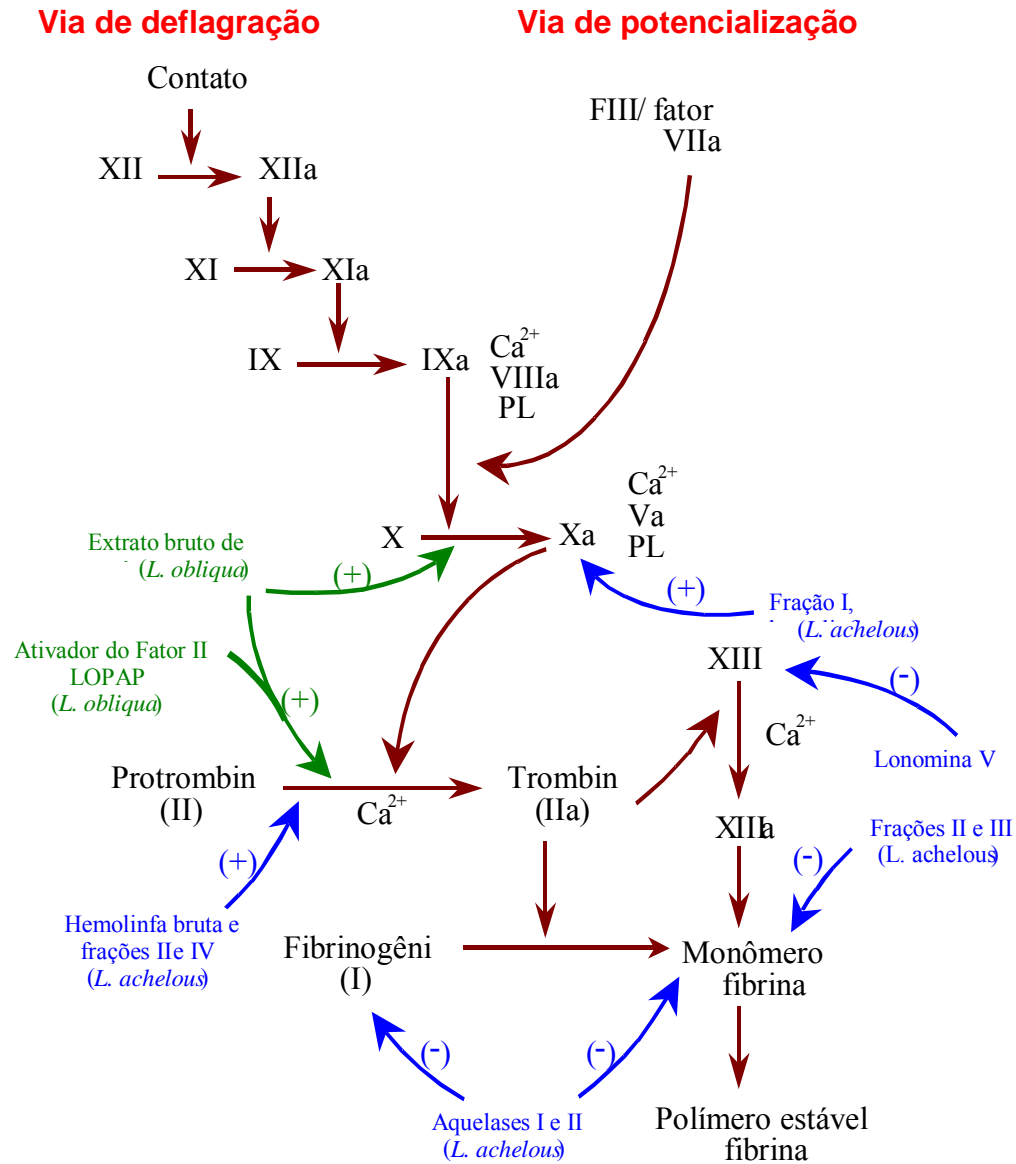


Figura 3- Cascata de coagulação sanguínea e ação dos componentes do veneno de *L. obliqua* (verde) e *L. achelous* (azul). (+): ativação; (-): degradação. Fonte: Marques, 1999.

1.5- Bioquímica do fator X

O fator X plasmático (FX) ou fator Stuart, uma serino protease dependente de vitamina K, circula como um zimógeno inativo de duas cadeias (Mr 17.000 e 49.000) unidas por ponte de dissulfeto. A clivagem se dá na sequência Arg-Lys-Arg, situada nos resíduos 140-142, que é removida, gerando assim a cadeia leve (1-139) e a cadeia pesada (143-448). A ativação do fator X ocorre na ligação Arg52-Ile53 da cadeia pesada, liberando um fragmento peptídico de 52 aminoácidos (Mr 10.000-14.000) da porção amino terminal da cadeia pesada.

O fator X é sintetizado como um pró-peptídeo que sofre subseqüentes clivagens, originando a proteína madura. A molécula deste fator possui múltiplos domínios, com estrutura tridimensional homóloga a outras proteínas vitamina K dependentes. Os domínios ricos em ácido γ -glutâmico (Gla) consistem de 40 aminoácidos, sendo cruciais nas interações dependentes de cálcio entre o fator e superfícies aniônicas de fosfolípidos, essencial para a ativação do zimógeno. Os domínios Gla são ligados a domínios hidrofóbicos ricos em aminoácidos aromáticos, seguidos de dois fatores de crescimento epidermal (EGF), cada um com aproximadamente 40 aminoácidos.

Dentro do domínio serino protease de proteínas K dependentes, localiza-se a tríade catalítica formada por Ser- His- Asp, formando o sítio ativo do mecanismo de catálise destas enzimas. O domínio serino protease do fator X e de outras proteínas vitaminas K dependentes é homólogo, na estrutura e sequência de aminoácidos, à tripsina e quimotripsina.

A cadeia leve do fator X humano apresenta sete domínios Gla, importantes para a ligação a membranas fosfolipídicas, com especificidade para hidrolisar a sequência Ile-Glu-Gly-Arg, na presença de cálcio (Nelsestuen et al., 1976; Nelsestuen, 1976).

O fator X sofrendo uma única clivagem peptídica na posição Arg51-Ile52 da cadeia pesada, torna-se ativado a fator Xa, passando a atuar como uma serino protease. O fator Xa é subseqüentemente convertido a fator Xa β , pela hidrólise de uma ligação peptídica Arg-Gly na região carboxi-terminal da proteína, produzindo um peptídeo de Mr

4000 (DiScipio et al., 1977; Fujikawa et al., 1975; Jesty e Nemerson, 1974). *In vitro* não há diferença na atividade destas duas formas de FXa (Fujikawa et al., 1975; Jesty e Nemerson., 1974).

O fator X pode ser ativado por várias proteases. Fisiologicamente as mais importantes são o fator IXa e VIIa (ou fator VII). O veneno *Vipera russelli* (RVV), uma metaloenzima que requer cátions divalentes, é usado para ativação do fator X *in vitro* (Fujikawa et al., 1974).

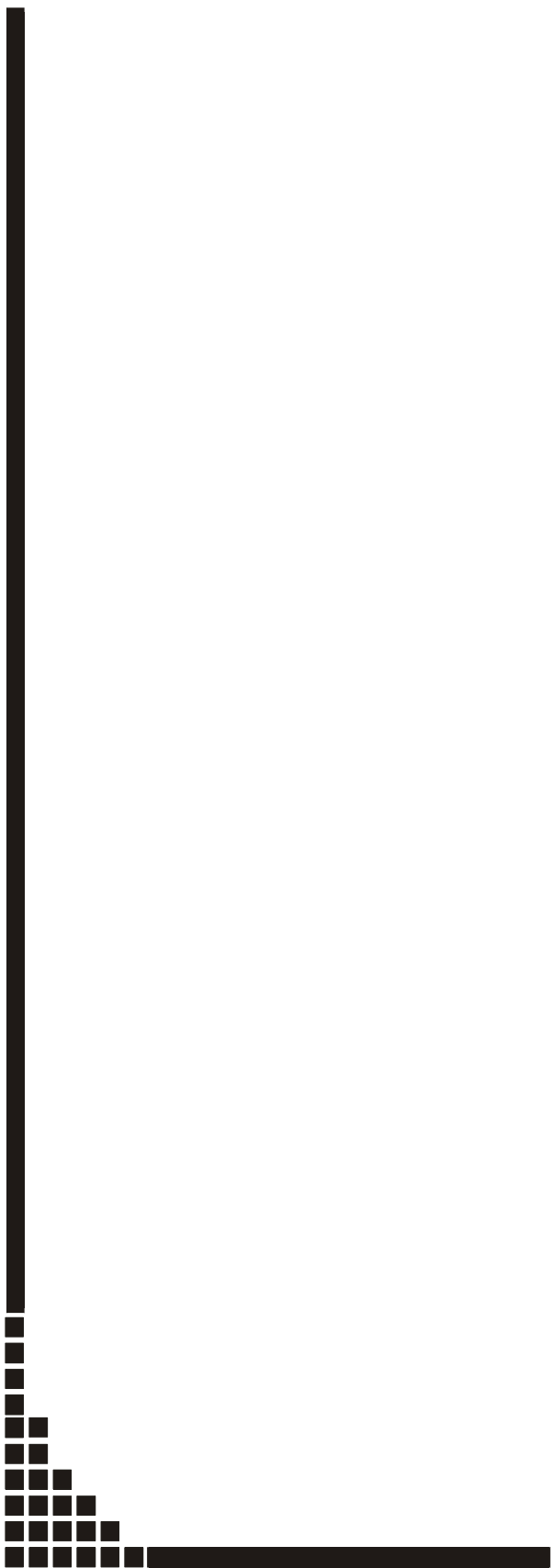
A ativação do fator X pela via de potencialização ocorre através do complexo de ligação da membrana, onde atua o fator tecidual (TF), e a protease fator VIIa (ou fator VII) na presença de Ca^{2+} . O TF liga-se ao fator VIIa ou fator VII, ativando-o rapidamente. Este complexo pode ativar tanto o fator IX como o fator X. Pela via intrínseca, ocorre a formação do complexo tenase, também dependente de Ca^{2+} e superfícies contendo fosfolípedes, proveniente da parede de plaquetas (van Diejen et al., 1981), monócitos, macrófagos (McGee e Li, 1991) e células endoteliais. Células endoteliais também possuem sítios de ligação específicos de alta afinidade para o fator IX e IXa, podendo ativar fator X na presença de fator VIII (Stern et al., 1983; Stern et al., 1985).



2- OBJETIVO GERAL

Tendo em vista a importância da síndrome hemorrágica causada pelo envenenamento por *L. obliqua*, o conhecimento incompleto sobre os mecanismos e fatores coagulantes e anticoagulantes do veneno, e a identificação de atuação do veneno na ativação da cascata de coagulação, o objetivo deste trabalho foi:

- Purificar e caracterizar bioquimicamente a proteína do veneno de *L. obliqua* responsável pela atividade ativadora do fator X, um dos fatores procoagulantes do veneno.



3- TRABALHO PUBLICADO

Os dados obtidos com este trabalho foram publicados no artigo:

“Purification and initial characterization of a novel protein with factor Xa activity from *Lonomia obliqua* caterpillar spicules.”

Lilla S, Pereira R, Hyslop S, Donato JL, Le Bonniec BF e de Nucci G.

Journal of Mass Spectrometry, 2005; 40: 405-12.

Apresenta-se a seguir cópia do artigo.

Purification and initial characterization of a novel protein with factor Xa activity from *Lonomia obliqua* caterpillar spicules

S. Lilla,¹ R. Pereira,¹ S. Hyslop,² J. L. Donato,¹ B. F. Le Bonniec³ and G. de Nucci^{1*}

¹ Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil

² Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

³ INSERM U428, Faculté de Pharmacie, Université Paris V, 75270 Paris Cedex 06, France

Received 19 May 2004; Accepted 18 November 2004

A novel protein with factor Xa-like activity was isolated from *Lonomia obliqua* caterpillar spicules by gel filtration chromatography and reversed-phase high-performance liquid chromatography. The protein had a mass of 20745.7 Da, as determined by mass spectrometry, and contained four Cys residues. Enzymatic hydrolysis followed by *de novo* sequencing by tandem mass spectrometry was used to determine the primary structure of the protein and the cysteine residues linked by disulfide bridges. The positions of 24 sequenced tryptic peptides, including the N-terminal, were deduced by comparison with a homologous protein from the superfamily Bombycoidea. Approximately 90% of the primary structure of the active protein was determined. Copyright © 2005 John Wiley & Sons, Ltd.

KEYWORDS: blood coagulation; caterpillars; factor Xa; envenoming; electrospray time-of-flight mass spectrometry

INTRODUCTION

Blood clotting can be activated via the intrinsic or extrinsic pathway. The intrinsic pathway begins with the contact phase, which involves the interaction of factor XII, kallikrein, high molecular mass kininogen, a foreign surface and factor XI. The product of this reaction, factor XIa, converts factor IX to factor IXa, which subsequently hydrolyzes factor X to factor Xa in the presence of activated factor VIII, phospholipid and calcium. In contrast, the extrinsic pathway is initiated when plasma factor VII/VIIa binds to tissue factor (TF) (thromboplastin) to form a complex that proteolytically activates factors IX and X. Once factor Xa is formed by either pathway, it can bind factor Va, phospholipid and calcium to form the prothrombinase complex that converts prothrombin to thrombin, which in turn clots fibrinogen.¹ Factor X is one of the five vitamin K-dependent blood coagulation proteins, the others being prothrombin, factor VII, factor IX and protein C. Factor X is a glycoprotein with a pivotal role in blood coagulation, and can be activated by intrinsic and extrinsic activating complexes, trypsin and certain snake venom.^{2–5}

An acquired bleeding deathless caused by contact with the body secretions of *Lonomia* caterpillars was first described by Arocha-Piñango.⁶ Many other cases have since been

reported in Venezuela,^{7–10} Brazil¹¹ and French Guyana.¹² The species *Lonomia obliqua* (Walker), which differs from *Lonomia achelous* (Cramer) genetically,¹³ is found principally in the south of Brazil. The symptoms of envenoming by *L. obliqua* are similar to those seen in accidents with *L. achelous* in Venezuela, even though the two species have different geographical distributions. Spicules or bristles of *L. obliqua* caterpillars contain a factor X activator and a calcium-dependent prothrombin activator¹⁴ that could account for the procoagulant activity of the venom.

The advent of complete genome sequences and improvements in mass spectrometric methods have accelerated the identification and analysis of proteins. In many cases, the characterization of a protein with modern tandem instruments is reduced to identifying the protein in a database and subsequently locating post-translational modifications. In contrast, determining the primary structure of a protein from a species whose genome is partially or totally unknown can be a difficult task. This is the case with toxins present in the venom of caterpillars of the saturniid moth *Lonomia obliqua*, the genome of which has not yet been sequenced; only one protein sequence and one gene sequence from this species are present in the NCBI database. In this paper, we describe the purification, partial characterization and sequence of a protein with factor Xa activity present in the venom of this species.

EXPERIMENTAL

Materials

Chromogenic substrates were purchased from Chromogenix (Mölnådal, Sweden). The substrates were dissolved in H₂O

*Correspondence to: G. de Nucci, Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (USP), São Paulo 05508-900, SP, Brazil. E-mail: denucci@dglnet.com.br
Contract/grant sponsor: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; Contract/grant number: 910219/94-0.
Contract/grant sponsor: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP); Contract/grant number: 02/01911-2.

and stored in aliquots at -20°C until used. Human purified factor X, sequencing grade bovine pancreatic trypsin and the other reagents were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). HPLC-grade solvents and reagents were from Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Superdex 75 and HiTrap Sepharose-Q were purchased from Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, USA). A C18 column ($4.6 \times 250\text{ mm}$) (Vydac, Hesperia, CA, USA) was used for reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). A 15 cm column ($75\text{ }\mu\text{m}$ i.d.) packed with C18 PepMap Resin and a precolumn cartridge (i.d. $300\text{ }\mu\text{m}$) also packed with C18 PepMap resin (both from LC-Packings) were used for capillary chromatography.

Preparation of spicule extract

Lonomia obliqua caterpillars collected in Passo Fundo (Rio Grande do Sul, Brazil) were frozen in liquid N_2 and the spicules harvested by cutting at their base. During this procedure, the caterpillars were handled with long tweezers and protective gloves were worn to avoid accidental inoculation of venom by cut spicules. Proteins were extracted by grinding the spicules with a mortar and pestle in 100 mM Tris-HCl, pH 7.4. Following centrifugation for 25 min at 2000 g at 4°C , the resulting supernatant was filtered through a $0.22\text{ }\mu\text{m}$ filter and stored at -20°C .¹⁴ The protein content of the extract was determined by a modification of the Lowry assay, using bovine serum albumin as standard.¹⁵

Amidolytic activity on the chromogenic substrate S2222

Factor X activation was assayed by mixing $10\text{ }\mu\text{l}$ of factor X ($2\text{ }\mu\text{M}$) with $10\text{ }\mu\text{l}$ of extract ($\sim 60\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$) or $10\text{ }\mu\text{l}$ of the chromatographic fractions in 96-well plates. In some experiments, factor X was excluded in order to test for factor Xa-like activity. After the addition of $80\text{ }\mu\text{l}$ ($100\text{ }\mu\text{M}$) of Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-pNA (S2222), the increase in absorbance at 405 nm was followed for 180 min in a SpectrumMax340 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).¹⁶

Gel filtration and ion-exchange chromatography

Lonomia obliqua spicule extract (20 mg) was applied to a column ($1.6 \times 60\text{ cm}$) of Superdex 75 equilibrated and eluted (30 ml h^{-1}) with 100 mM Tris-HCl, pH 7.8, at 20°C . The elution profile was monitored at 280 nm . Fractions (2 ml) containing factor Xa-like activity were further purified by RP-HPLC.

Reversed-phase liquid chromatography of protein and peptides

RP-HPLC was carried out using a Shimadzu system consisting of two binary pumps (LC-10ADvp) and a UV detector (SPD-10Avp). All of the modules were controlled by an SCL-10ADvp unit connected to a computer running ClassVP software. The peptides were fractionated on a 218TP54 Vydac C18 column ($5\text{ }\mu\text{m}$, $250 \times 4.6\text{ mm}$ i.d.). Solvent A was 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water and solvent B was acetonitrile in 0.1% TFA. The samples were injected manually through a Rheodyne valve on to the RP-HPLC column equilibrated with 5% of solvent B. A

linear gradient (5–70%) of B was applied at a flow-rate of 1 ml min^{-1} for 90 min. The elution profile of the proteins was monitored at 220 and 280 nm .

Reduction and alkylation

Lyophilized protein from RP-HPLC was resuspended in 8 M urea containing 10 mM DTT at pH 8.0 and the disulfide bridges then reduced by incubation at 37°C for 2 h. Since the number of cysteine residues in the protein was initially unknown, the optimum concentration of iodoacetamide for alkylating the free thiols were derived empirically, based on results obtained from incubations using various concentrations of iodoacetamide and different amounts of protein, with each mixture being analysed by mass spectrometry.¹⁷ Based on these preliminary experiments, a 30% molar excess of iodoacetamide relative to the total number of thiols was eventually used, and the mixture was incubated for 1.5 h at 37°C in the dark. The reaction was stopped by injecting the mixture on to the RP-HPLC column followed by freeze-drying of the peak collected.

Enzymatic hydrolysis

Hydrolysis with sequencing-grade bovine pancreatic trypsin was performed in 0.4% ammonium bicarbonate, pH 8.5, for 4 h at 37°C , at an enzyme-to-substrate ratio of 1:100 (w/w). The reaction was stopped by lyophilization.

Mass spectrometry

All mass spectra were acquired using a quadrupole time-of-flight (TOF) hybrid mass spectrometer (Q-TOF Ultima, Micromass, Manchester, UK) equipped with a nano Z-spray source operating in the positive ion mode. The ionization conditions used included a capillary voltage of 2.3 kV, a cone voltage and RF1 lens voltage of 30 and 100 V, respectively, and a collision energy of 10 eV. The source temperature was 70°C and the cone gas was N_2 at a flow-rate of 801 h^{-1} ; no nebulizing gas was used to obtain sprays. Argon was used for collisional cooling and for fragmentation of ions in the collision cell. External calibration with sodium iodide was done over the mass range from m/z 50 to 3500. All spectra were acquired with the TOF analyser in 'V-mode' (TOF voltage = 9.1 kV) and the MCP voltage set at 2150 V.

Intact protein analysis

Lyophilized RP-HPLC fractions of intact native and alkylated protein were dissolved in 90% H_2O –10% acetonitrile in 0.1% TFA and introduced into the mass spectrometer source with a syringe pump at a flow-rate of 500 nl min^{-1} . Mass spectra were acquired over the mass range m/z 900–3500 for native protein and m/z 600–3000 for alkylated protein, both at a scan rate of 1 s per scan. The masses were calculated using a MassLynx-MaxEnt 1 deconvolution algorithm.

De novo sequencing of tryptic peptides

Alkylated tryptic peptides fractionated by RP-HPLC were collected manually, lyophilized and resuspended in 80% H_2O and 20% acetonitrile in 0.1% TFA. Each peptide was introduced separately into the mass spectrometer source with a syringe pump at a flow-rate of 500 nl min^{-1} . An

electrospray ionization mass spectrum was acquired for each RP-HPLC fraction over the mass range m/z 400–2000 followed by a tandem mass spectrum on ions of interest. Different collisional energies were used, depending on the mass and charge state of the selected ions. The resulting tandem mass spectra were deconvoluted using the MassLynx-MaxEnt 3 algorithm. Singly charged spectra were processed manually using the PepSeq application included in MassLynx.

Reversed-phase capillary chromatography/mass spectrometry

Reversed-phase liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry (LC/ESI-MS) was carried out using a Waters CapLC ternary pump system connected through a stream-select valve module to the nano Z-spray source of the mass spectrometer. The sample was injected into the system through the CapLC autosampler using the 'microliter pickup' injection method. Solvent A consisted of 95% H_2O and 5% acetonitrile in 0.1% TFA and solvent B contained 95% acetonitrile and 5% H_2O in 0.1% TFA. Solvent C consisted of 0.1% TFA in H_2O .

The protein digest was preconcentrated and desalted on a precolumn cartridge (300 μm i.d.) packed with C18 PepMap resin and connected to pump C through the stream-select valve module. The preconcentration/desalting step was performed at 30 $\mu l \text{ min}^{-1}$ over 3 min using pump C. After switching to pumps A and B, a gradient was applied to the precolumn cartridge and then used to elute the sample from the analytical column (15 cm \times 75 μm i.d.) packed with C18 PepMap resin. The column was equilibrated in 5% of solvent B and a linear gradient from 5 to 70% of B was applied over 60 min at a flow-rate of 200 $n l \text{ min}^{-1}$ using a precolumn split with a pump delivering at 1 $\mu l \text{ min}^{-1}$. TOFMS analysis was carried out on-line with capillary chromatographic separation of the native and alkylated protein tryptic digests over the mass range m/z 400–2000 at a scan rate of 2 s per scan.

Data-dependent acquisition was carried out on-line with capillary chromatographic separation only for the alkylated protein tryptic digest. An initial TOF-MS survey scan was acquired over the mass range m/z 400–2000 each second, with switching criteria for MS to MS/MS that included ion abundance and charge state. MS/MS data were acquired over the mass range m/z 50–2000 each second for up to three co-eluting peptides but only for doubly and triply charged ions. Switch back from the MS/MS to the MS mode was allowed after 20 s. The collisional energy used varied automatically according to the mass and charge state of the eluting peptides. The fragmentation data were compared with information in the NCBI database using the software Mascot MS/MS Ion Search.¹⁸

RESULTS

Amidolytic activity on the chromogenic substrate S2222

Lonomia obliqua spicule extract showed similar activity towards the chromogenic substrate S2222 in the absence or presence of human purified factor X (Fig. 1). This similar

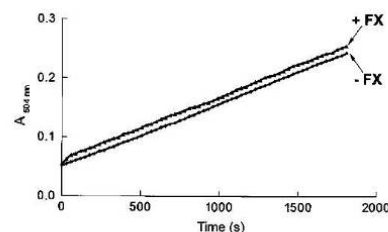


Figure 1. Degradation of S2222 by *Lonomia obliqua* spicule extract in the absence (–) and presence (+) of factor X (FX). Enzyme activity was assayed as described in the Experimental section.

level of activity suggested the presence of a factor Xa-like protein in the spicules.

Purification and analysis of the intact protein

Fractionation of the spicule extract on Superdex 75 resulted in several protein peaks, with activity towards S2222 occurring in three main peaks (Fig. 2). A 200 μl aliquot from a pool of gel-filtration fractions 45–60 was injected directly on to the RP-HPLC column and gave the chromatogram shown in Fig. 3. The elution profile monitored at 220 nm showed an intense peak at 50.2 min (labelled A in Fig. 3). This peak was collected manually, lyophilized and analysed by MS. The spectrum for this peak indicated a single protein with a mass of 20745.7 Da (Fig. 4(a)). To detect the presence and number of cysteine residues, the eluted protein was reduced and alkylated. The mass measured after alkylation was 20978.4 Da, indicating the presence of four Cys-CAM modified residues (Fig. 4(b)).

Capillary LC/MS and LC/MS/MS of the native and alkylated protein

Samples of native and alkylated protein were digested with trypsin and the digests were analyzed by capillary LC/ESI-MS. Table 1 gives the monoisotopic masses of the tryptic peptides obtained for the native and alkylated proteins and shows that these proteins had 13 peptides in common.

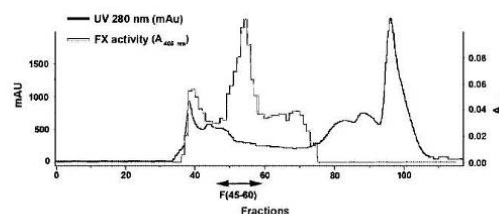


Figure 2. Elution profile of *Lonomia obliqua* spicule extract on Superdex 75 showing the location of factor Xa-like activity. The extract was prepared as described in the Experimental section and applied (20 mg) to a column of Superdex 75 previously equilibrated with 0.1 M Tris-HCl, pH 7.8. The proteins were eluted at 20 °C with the same buffer at a flow-rate of 30 $ml \text{ min}^{-1}$ and the elution profile was monitored at 280 nm. Fractions of 2 ml were collected and those underlined (F45–60) were pooled for RP-HPLC.

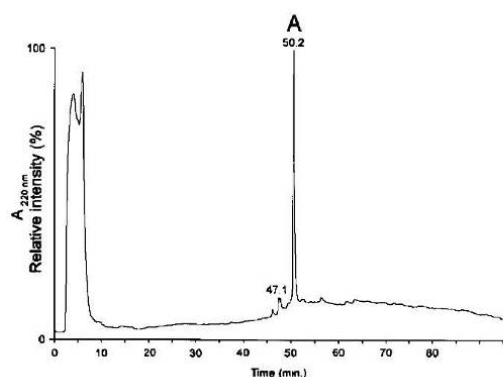


Figure 3. RP-HPLC elution profile at 220nm of fractions 45–60 from the gel filtration chromatography step (Fig. 2).

After alkylation, eight peptides originated from four high-mass peptides contained in the native tryptic digest. To determine the identity of the unknown protein, the alkylated digest was further analyzed by capillary LC/ESI-MS/MS in data-dependent acquisition mode. The mass spectrometer generated 48 tandem mass spectra on doubly and triply charged ions. The data obtained were processed using the Mascot MS/MS Ion Search software.¹⁸ None of the tryptic

peptide sequences matched any of the proteins contained in the NCBI database, thus confirming the absence of sequence data for this protein in the literature (results not shown).

De novo sequencing of alkylated protein

To obtain detailed structural information, the alkylated protein digest was fractionated by RP-HPLC (Fig. 5) and each chromatographic peak marked in the chromatogram was collected manually and lyophilized. *De novo* sequencing by ESI-MS/MS was carried out for each peptide peak. The sequences deduced from the ESI-MS/MS of 25 peptides from the alkylated protein are shown in Table 2. Figure 6 shows an example of the fragmentation spectrum of a peptide contained in peak 10 at 1318.53 Da. In none of the sequences were Ile and Leu residues discriminated since they were indistinguishable in low-energy collision-induced dissociation spectra. Because of the external calibration that was applied to all of the spectra, it was also not possible to distinguish between Gln and Lys residues based on the 0.036 Da that separates these amino acids, except for the Lys marked in bold in Table 2, which were deduced by analysis of the cleavage and missed cleavage sites of the enzyme. The chromatographic peaks not reported in Table 2 did not yield acceptable fragmentation data because of the small amount of sample.

Preliminary experiments with capillary LC/ESI-MS/MS in data-dependent acquisition mode for alkylated protein

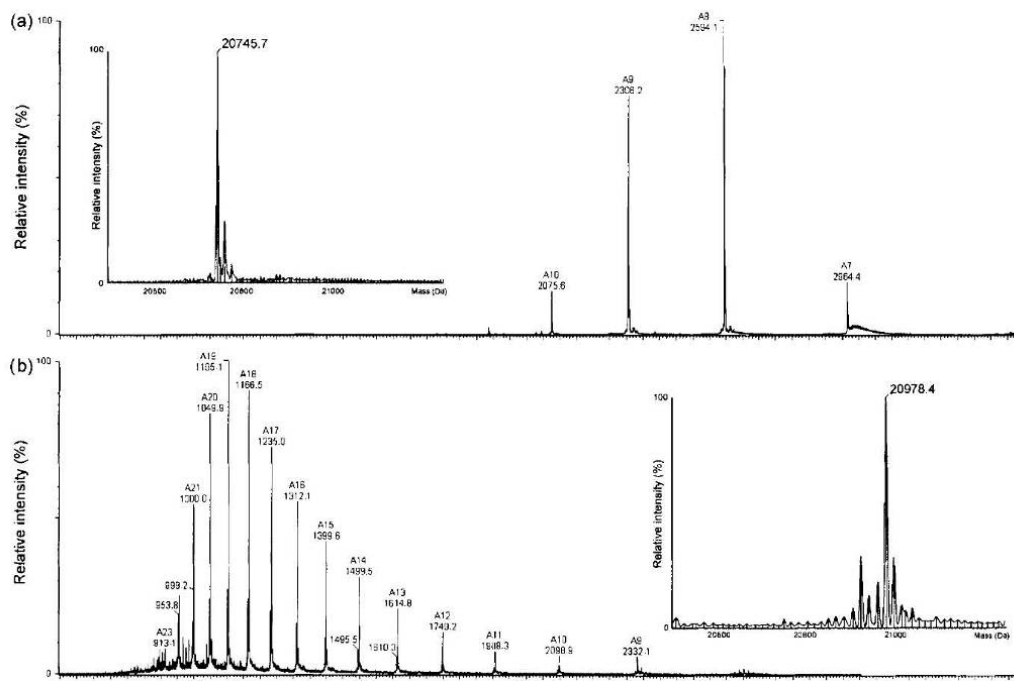


Figure 4. Electrospray positive mass spectrum of peak A (from Fig. 3) in the native state (a) and after reduction and alkylation with iodoacetamide (b). The corresponding deconvoluted mass spectrum is shown in the inset. The mass shift was consistent with the presence of four Cys residues.

Table 1. Comparison of the monoisotopic masses of tryptic peptides derived by capillary LC/ESI-MS analysis of native and alkylated protein from peak A in Fig. 3^a

Retention time (min)	Molecular mass (Da)	
	Alkylated digest	Native digest
13.6	778.38 1007.52	778.43 —
13.9	752.31 1233.51	752.30 1233.53
14.7	887.46	—
15.0	1111.46	1111.49
18.2	1334.53 1621.78	— —
21.7	799.39	—
23.5	1100.45 1318.53	1100.47 —
28.0	671.29	—
36.7	1204.58	1204.59
37.3	—	<u>3377.50</u>
38.1	861.51	861.47
39.0	—	<u>3249.41</u>
39.3	1076.48 2694.16	1076.50 —
45.2	1780.72	1780.73
47.5	2149.94	—
49.71	1764.70	1764.67
50.9	999.55	999.57
54.5	— —	<u>3652.61</u> <u>3636.57</u>
55.0	2064.94 2434.03	2064.96 —
58.1	1954.93 2058.94	1955.00 2058.97

^a The alkylated peptide masses are shown in bold in the Alkylated digest column. The masses corresponding to peptides containing a disulfide bridge are underlined in the Native digest column.

confirmed the absence of sequence data for this protein in the literature. As a result, sequence homology between proteins of similar function expressed in different species was used to establish the original position of each sequenced tryptic peptide in the intact native protein.

Each *de novo* sequenced peptide was submitted separately to the NCBI database using the protein search program BLAST-p,¹⁹ with the search being restricted to all proteins sequenced from the superfamily Bombycoidea. All of the *de novo* peptides contained at least a portion of their sequence that matched three proteins of the superfamily Bombycoidea: biliverdin binding protein-I (202 amino acids, gi|18857921|) and biliverdin binding protein-II (200 amino acids, gi|18642498|), both from *Samia cynthia ricini*, and bombyrin (201 amino acids, gi|13928531|) from *Bombyx mori*.

Based on the positional matches of the *de novo* sequenced peptides with the three homologous proteins, it was possible to deduce the original positions of these peptides in the native protein. The partial protein sequence obtained

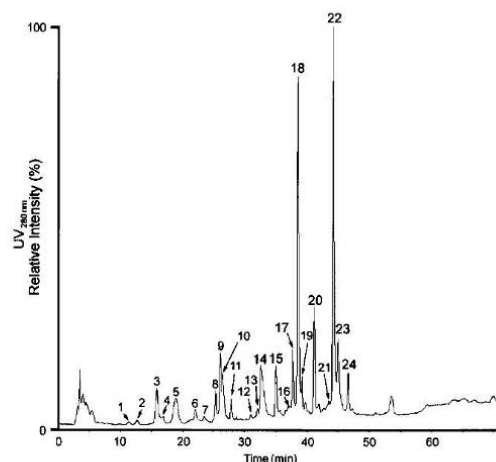


Figure 5. RP-HPLC elution profile of peptides in the tryptic digest of the alkylated protein from peak A in Fig. 3.

was resubmitted to BLAST-p with the search again being restricted to the superfamily Bombycoidea. The database search detected the conserved domain of lipocalin family proteins and returned only the three homologous proteins already found using the peptides. The alignment of this novel protein with biliverdin binding protein-II is shown in Fig. 7.

Disulfide bridge assignment

Six peptides with molecular masses of 1318.53 Da (peak 10), 671.29 Da (peak 11), 2694.16 Da (peak 14), 2434.03 Da (peak 22), 1334.53 Da (peak 6) and 779.39 Da (peak 8) were found to contain one iodoacetamide-alkylated cysteine (Table 2). The last two peptides were an oxidized form and a missed cleavage peptide, respectively, thus confirming the presence of four Cys residues.

Combining the molecular masses of all of the alkylated peptides and comparing the resulting value with the data obtained by digestion of the native protein showed that the Cys residue contained in the 1318.53 Da peptide formed a disulfide bridge with the Cys residue in the 2434.03 Da peptide, thus explaining the origin of the 3636.57 Da peptide that eluted at 50.2 min and that was only seen in the tryptic digest of the native protein (the theoretical monoisotopic mass based on the deduced sequence was 3636.68 Da). The other disulfide bridge occurred between the Cys residues in the alkylated peptides of 2694.16 and 671.29 Da, thus explaining the origin of the 3249.41 Da peptide seen in the tryptic digest of the native protein at 46.2 min but absent in the digest of alkylated protein (the theoretical monoisotopic mass based on the deduced sequence was 3249.51 Da).

The identity of the native tryptic peptide with a mass of 3377.50 Da that eluted at 42.3 min was explained by the combination of a 2694.16 Da peptide with a 779.39 Da peptide that had a missed cleavage site at the Lys residue (the theoretical monoisotopic mass based on the deduced

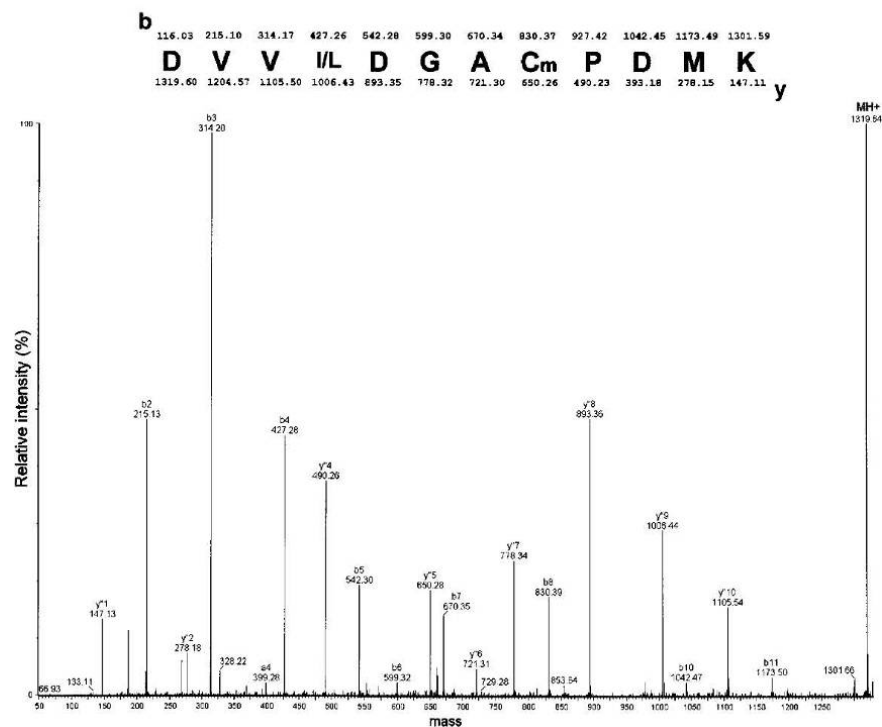


Figure 6. ESI-MS/MS of the 1318.56 Da tryptic peptide eluted in RP-HPLC fraction 10 shown in Fig. 5 and identified as the N-terminal tryptic peptide of the alkylated protein component under peak A in Fig. 3. The sequence and theoretical masses of the y- and b-series ions are also shown.

Query:	1	D	V	V	I/L	D	G	A	C	P	D	M	K	A	V	S	K	F	D	M	N	A	Y	Q	G	T	W	Y	E	I/L	K	30
BBP-II:	1	D	V	I	L	D	G	P	C	P	N	F	K	G	V	S	N	F	D	T	K	A	Y	Q	G	A	W	Y	Q	I	T	30
Query:	31	K/Q	F	P	G	N	I/L	V	T	N	G	D	C	G	S	V	E	Y	T	P	D	N	G	I/L	I/L	K	-	-	A	G	H	58
BBP-II:	31	K	L	T	I	G	N	E	A	H	G	E	C	G	I	G	E	Y	T	V	V	G	D	V	L	K	V	N	H	S	H	60
Query:	59	V	E	D	I/L	E	K	F	V	V	G	V	I/L	T	K	-	N	A	G	T	S	D	A	E	I/L	T	I/L	S	V	V	87	
BBP-II:	61	I	V	D	G	V	R	K	T	L	W	G	V	L	S	R	A	D	E	S	N	G	S	G	K	L	W	L	S	T	V	90
Query:	88	V	G	D	Y	V	R	V	A	P	I/L	W	I/L	V	S	T	D	Y	D	N	Y	A	I/L	G	Y	S	C	K	-	-	114	
BBP-II:	91	A	G	D	N	V	R	I	F	P	Y	W	V	V	S	T	D	Y	K	N	Y	S	I	V	F	S	C	V	Y	H	K	120
Query:	114	-	-	-	-	V	N	I/L	W	I/L	I/L	S	R	T	K	T	I/L	T	E	T	S	K	-	-	-	-	F	I/L	133			
BBP-II:	121	K	S	D	V	H	T	V	H	L	W	V	L	S	R	T	K	I	L	S	E	G	A	S	T	I	V	N	N	F	L	150
Query:	134	K	E	H	S	K	E	F	D	K/Q	S	K	F	V	E	T	D	F	S	E	K	A	C	F	F	K	K	S	H	V	163	
BBP-II:	151	K	D	H	A	R	E	F	P	E	N	R	F	V	E	N	D	V	S	N	E	A	C	S	Y	R	K	T	S	A	Y	180
Query:	164	T	V	P	F	K	-	167																								
BBP-II:	181	T	I	P	V	G	I	186																								

Figure 7. Alignment of the deduced amino acid sequence of the protein eluted in peak A in Fig. 3 with biliverdin binding protein-II. The cysteine residues linked by a disulfide bridge are also shown. The minus signs indicate regions of the sequence that were not determined. Leucine and isoleucine residues are indicated as I/L and glutamine and lysine are shown as K/Q. The trypsin cleavage sites are underlined.

Table 2. Sequence obtained by ESI-MS/MS based on the alkylated tryptic peptides derived from the RP-HPLC profile shown in Fig. 5^a

HPLC fraction	Molecular mass (Da)	Deducted sequence
1	752.31	EFDK/QSK
2	778.38	TI/LTETSK
3	1007.52	TKTI/LTETSK
	1233.51	EHSKEFDK/QSK
5	887.46	FI/LKEHSK
	1111.46	AGHVEDDI/LEK
6	1334.53	DVVI/LDGA <u>Ccm</u> PDMoxK
7	1621.78	FI/LKEHSKEFDK/QSK
8	799.39	A <u>Ccm</u> FFKK
9	1100.45	FVETDFSEK
10	1318.53	DVVI/LDGA <u>Ccm</u> PDMK
11	671.29	A <u>Ccm</u> FFK
13	1204.58	KSHVYTVPFK
14	861.51	FVVGVI/LTK
	1076.48	SHVYTVPFK
	2694.16	K/QFPNGI/LVT NGD <u>Ccm</u> GSVEY TPDNGI/LI/LK
17	2166.08	AVSKFD MoxNA YK/QGTWYEI/LK
	2149.94	AVSKFDMNAY K/QGTWYEI/LK
18	1764.70	FDMNAYK/QGTWYEI/LK
	1780.72	FD MoxNAYK/QGTWYEI/LK
20	999.55	VNI/LWI/LISR
22	2064.94	NAGTSDAEI/LT I/LSVVVG DYVR
	2434.03	VAPI/LWI/LVST TDYDNYAI/LGYSCmK
24	1954.93	AGHVEDDI/LEK FVVGVI/LTK
	2058.94	VAPI/LWI/LVST DYDNYAI/LGY

^a Leucine and isoleucine residues are reported as I/L and glutamine and lysine residues are reported as K/Q. The lysine residues indicated in bold were deduced from the cleavage and missed cleavage by trypsin. All masses reported are monoisotopic.

sequence was 3377.61 Da). The native tryptic peptide with a mass of 3652.61 Da at 50.2 min was found to be an oxidized form of peptide 3636.57 Da (the theoretical monoisotopic mass based on the deduced sequence was 3652.68 Da), as

confirmed by the presence of an alkylated peptide at 1334.53 Da that eluted in peak 6.

DISCUSSION

Envenoming by caterpillars of the moth *L. obliqua* (Walker) in southern Brazil can result in the depletion of blood clotting factors and lead to disseminated intravascular coagulation with subsequent haemorrhage and acute renal failure that may prove fatal.¹⁰ Donato *et al.*¹⁴ reported that a spicule extract from these caterpillars contained prothrombin and factor X-activating activities, which suggested that the steady activation of these two proteins could result in the depletion of blood clotting factors. The active factor was suggested to be a protein belonging to the serine protease family of enzymes.

Using gel filtration (Sephadex G-75) and RP-HPLC (C4 column), Reis *et al.*²⁰ purified a 69 kDa protein from *L. obliqua* caterpillar spicule extract. This protein, known as LOPAP (*Lonomia obliqua* prothrombin activator protease), caused thrombus formation, unclottable blood and fibrinogen depletion when injected intravenously into rats. The purified protein generated thrombin from prothrombin, and this thrombin was able to clot purified human fibrinogen and plasma. The partial amino acid sequence of LOPAP showed no similarity to any known prothrombin activator.²¹ Despite the marked difference in the molecular masses of LOPAP and the protein described here, there was a 100% homology in the first 30 amino acids of the N-terminal sequence. No similarity was found for the short, internal amino acid sequences described for LOPAP, except for fragment III that had the sequence FDQSKFVETDFSEKACFF.

Most arthropod blood feeders have proteins that induce vasodilatation, inhibit blood coagulation and reduce inflammation, thereby counteracting attempts by the host organism to re-establish homeostasis. Despite this diversity, in many cases the antihemostatic activities in these organisms resides in proteins with lipocalin folds.²² The lipocalins are an ancient family of proteins that occur in bacteria, protozoists, plants, arthropods and chordates.²³ The sequence described here showed high homology with proteins of the lipocalin family, although none of these proteins has been reported to have factor X-activating or factor Xa-like activity.

The fact that venoms and unrelated secretions of non-venomous animals²⁴ contain enzymes that can affect hemostasis indicates that these highly diverse proteins share a long history and may have a common origin. Over time, the recruitment and diversification of the genes encoding these proteins may have led to the appearance of a group of enzymes that could be used as a defense against a range of predators.²⁵

Acknowledgments

The authors thank Drs Irineu Lorini (EMBRAPA, Passo Fundo, RS, Brazil) and Lizete Lorini (Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo) for supplying the caterpillars. This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [CNPq/INSERM (FRA) Grant 910219/94-0] and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Grant 02/01911-2).

REFERENCES

- Mann KG, Butenas S, Brummel K. The dynamics of thrombin formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003; **23**: 17.
- Fujikawa K, Coan MH, Legaz ME, Davie EW. The mechanism of activation of bovine factor X (Stuart factor) by intrinsic and extrinsic pathways. *Biochemistry* 1974; **13**: 5290.
- Furukawa Y, Matsunaga Y, Hayashi K. Purification and characterization of a coagulant protein from the venom of Russell's viper. *Biochim. Biophys. Acta* 1976; **453**: 48.
- Furie B, Furie BC. The molecular basis of blood coagulation. *Cell* 1988; **53**: 505.
- Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry* 1991; **30**: 10363.
- Arocha-Piñango CL. Fibrinolysis producida por contacto con orugas: comunicación preliminar. *Acta Cient. Venez.* 1967; **18**: 136.
- Arocha-Piñango CL, Perales J, Carvajal Z. Studies on the degradation of fibrinogen by proteolytic enzymes from the larvae of *Lonomia achelous* (Cramer). *Thromb. Haemost.* 1981; **45**: 233.
- Arocha-Piñango CL, De Bosch NB, Nouel A, Torres A, Goldstein C, Nouel A, Argüello A, Carvajal Z, Guerrero B, Ojeda A, Rodríguez A, Rodríguez S. Six new cases of a caterpillar-induced bleeding syndrome. *Thromb. Haemost.* 1992; **67**: 402.
- Arocha-Piñango CL, Guerrero B. *Lonomia* genus caterpillar envenomation: clinical and biological aspects. *Haemostasis* 2001; **31**: 288.
- Arocha-Piñango CL, Guerrero B. Hemorrhagic syndrome induced by caterpillars. Clinical and experimental studies. *Rev. Invest. Clin.* 2003; **44**: 155.
- Kelen EMA, Picarelli ZP, Duarte AC. Hemorrhagic syndrome induced by contact with caterpillar of the genus *Lonomia* (Saturniidae, Hemileucinae). *J. Toxicol. Toxin Rev.* 1995; **14**: 283.
- Hommel D, Bouchareine L, Hulin A. Envenimation par une chenille de lépidoptère: *Lonomia achelous*. Revue de littérature. A propos de deux cas en Guyane Française. *Sem. Hop. Paris* 1995; **71**: 9.
- Lemaire C. Revision du genre *Lonomia* Walker. *Ann. Soc. Entomol. Fr. (N.S.)* 1972; **8**: 767.
- Donato JL, Moreno RA, Hyslop S, Duarte A, Antunes E, Le Bonniec BF, Rendu F, de Nucci G. *Lonomia obliqua* caterpillar spicules trigger human blood coagulation via activation of factor X and prothrombin. *Thromb. Haemost.* 1998; **79**: 539.
- Peterson, GL. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 1977; **83**: 346.
- Erskine JG, Walker, Davidson JF. Maintenance control of oral anticoagulant therapy by an automated chromogenic substrate assay of factor X. *Clin. Lab. Haematol.* 1982; **4**: 179.
- Boja ES, Fales HM. Overalkylation of a protein digest with iodoacetamide. *Anal. Chem.* 2001; **73**: 3576.
- <http://www.matrixscience.com>.
- <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.
- Reis CV, Farsky SH, Fernandes BL, Santoro ML, Oliva ML, Mariano M, Chudzinski-Tavassi AM. *In vivo* characterization of LOPAP, a prothrombin activator serine protease from the *Lonomia obliqua* caterpillar venom. *Thromb. Res.* 2001; **102**: 437.
- Reis CV, Portaro FC, Andrade SA, Fritzen M, Fernandes BL, Sampaio CA, Camargo AC, Chudzinski-Tavassi AM. A prothrombin activator serine protease from the *Lonomia obliqua* caterpillar venom (Lopap)—biochemical characterization. *Thromb. Res.* 2001; **102**: 427.
- Montfort WR, Weichsel A, Andersen JF. Nitrophorins and related antihemostatic lipocalins from *Rhodnius prolixus* and other blood-sucking arthropods. *Biochim. Biophys. Acta* 2000; **1482**: 110.
- Sanchez D, Ganfornina MD, Gutierrez G, Marin A. Exon-intron structure and evolution of the lipocalin gene family. *Mol. Biol. Evolut.* 2003; **20**: 775.
- Hahn BS, Cho SY, Wu SJ, Chang LM, Chang IM, Back K. Purification and characterization of a serine protease with fibrinolytic activity from *Tenodera sinensis* (Chinese Mantis). *Biochim. Biophys. Acta* 1999; **1430**: 376.
- Pinto AFM, Dobrovolski R, Gorini-Veiga AB, Almeida-Guimarães J. Lonofibrase, a novel α -fibrinogenase from *Lonomia obliqua* caterpillars. *Thromb. Res.* 2004; **113**: 147.



4- CONCLUSÃO E DISCUSSÃO GERAIS

Neste trabalho isolou-se uma proteína de 20745.7 Da do extrato de cerdas de *L. obliqua*. A proteína isolada apresentou atividade tipo fator Xa do sistema de coagulação. Com o uso de técnicas aplicadas a proteômica, foi determinada a sua seqüência de aminoácidos. Trata-se de uma proteína nova, ainda não seqüenciada, a qual apresenta uma grande identidade com outras proteínas da família das lipocalinas.

A família de lipocalinas é constituída de pequenas proteínas do meio extracelular, caracterizadas por se ligarem a pequenas moléculas, principalmente hidrofóbicas, como retinol, por sua ligação a receptores de membranas específicos e formação de complexos covalentes e não-covalentes com macromoléculas solúveis. A principal função destas proteínas é o transporte de moléculas biológicas, atuando na manutenção e controle celular. Muitas lipocalinas participam da regulação da homeostase celular como a apolipoproteína D e alfa-1 microglobulina (Flower, 1996; Flower et al., 2000).

Lipocalinas de insetos podem induzir vasodilatação, reduzir inflamação e interferirem na agregação de plaquetas e coagulação do sangue (Montfort et al., 2000). Para a espécie *Rhodnius prolixus* foram caracterizadas nove proteínas de saliva com atividade anti-hemostática, sendo sete destas pertencentes à família das lipocalinas. Surpreendentemente, outras duas lipocalinas anti-hemostáticas foram isoladas de *Rhipicephalus appendiculatus* (Keller et al., 1993; Paesen et al., 1999) e de *Triatoma pallidipennis* (Fuentes-Prior et al., 1997).

As proteínas anti-hemostáticas da saliva de *Rhodnius prolixus* são divididas em grupos característicos, sendo o um destes grupos constituído de quatro heme proteínas identificadas como lipocalinas, as quais são chamadas de nitroforinas (NP1-NP4), cada uma apresentando peso molecular em torno de 20 kD e três atividades distintas. São capazes de estocar e transportar óxido nítrico (NO), que quando liberado no tecido alvo, mediado pela enzima guanilato ciclase solúvel, no hospedeiro, resulta em uma cascata de sinais, causando relaxamento do músculo liso e vasodilatação (Bredt e Snyder, 1994; Schmidt e Walter, 1994; Ribeiro e Nussenzveig, 1993). As nitroforinas também sequestram a histamina, um agente mediador de reações inflamatórias e resposta imune, liberada pelas células do hospedeiro (Levy, 1996; Mannaioni et al., 1997; Ribeiro e Walker, 1994; Weichsel et al., 1998). A terceira atividade, desempenhada apenas pela NP2,

chamada de prolixin-S, é a inibição da via intrínseca da cascata de coagulação, impedindo a conversão do fator X em fator Xa (Zhang et al., 1998; Sun et al., 1996; Ribeiro et al., 1995; Hellman e Hawkins, 1965).

Um outro grupo de proteínas da saliva de *Rhodnius* consiste de três fatores anticoagulantes, chamados de RPAI 1-3, de “*Rhodnius prolixus* aggregation inhibitors”. Estudos indicam que estes fatores interferem com a ligação de plaquetas ao colágeno. Apresentam o peso de aproximadamente 19 kD e, através de clonagem e caracterização, baseado na homologia de suas seqüências, aparentemente também são lipocalinas (Francischetti et al., 2000).

As lipocalinas são proteínas tipicamente pequenas, com 160 a 180 resíduos de aminoácidos, caracterizada pela homologia e conservação de regiões específicas nas suas seqüências, apresentando em sua estrutura secundária folhas β antiparalelas, formando oito cordas β (“ β – strands”), que se arranjam formando uma espécie de cálice ou barril achatado capaz de ligar pequenas moléculas hidrofóbicas no seu interior (Flower, 1995; Flower, 1996; Flower et al., 2000).

A maioria das lipocalinas isoladas de insetos possuem um peso molecular de aproximadamente 20 kDa, assim como a proteína que se isola do extrato de cerdas de *L. obliqua*. Dentre estas se encontram a *biliverdin-binding protein*, isolada de hemolinfa de larvas de *Papilio xuthus* L., saturnídeo, com peso molecular estimado em 21 kDa (Yamanaka et al., 2000), e as *blue - proteins* (inseticianinas) da hemolinfa e tegumento de larvas de *Rhodinia fugax* (saturnídeo), com peso molecular de 23 e 24 kDa, as quais apresentam seqüência com cerca de 50% de identidade com biliproteínas de outros lepidópteros (Saito, 1998).

As lipocalinas são encontradas predominantemente em organismos eucarióticos, principalmente em vertebrados, embora foram identificadas também em outros filós. Fora dos vertebrados, o filo melhor exemplificado é o artropoda. A existência de lipocalinas procarióticas traz profundas implicações no entendimento da evolução destas proteínas (Flower et al., 2000; Sanchez et al., 2003). Apresentam grande variação estrutural e remarcada diversidade funcional, dentre e entre as espécies (Flower, 1996).



5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amarant T, Burkhardt W, Le Vine H, Arocha-Piñango CL, Parikh I. Isolation and complete amino acid sequence of two fibrinolytic proteinases from the toxic saturnid caterpillar *Lonomia achelous*. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1079: 214-21.

Arocha-Piñango CL. Fibrinolysis producida por contacto con orugas: comunicación preliminar. *Acta Cient Ven* 1967; 18: 136-140.

Arocha-Piñango CL, Layrisse M. Fibrinolysis produced by contact with a caterpillar. *Lancet* 1969; 1: 810-12.

Arocha-Piñango CL. A fibrinolytic agent from a Saturnid caterpillar. Partial purification and characterization. *Thromb Diath Haemorrh.* 1973; Feb 28; 29(1): 135-42.

Arocha-Piñango CL, Perales J, Carvajal Z. Studies on the degradation of fibrinogen by proteolytic enzymes from the larvae of *Lonomia achelous* (Cramer). *Thromb. Haemost.* 1981; 45: 233-36.

Arocha-Piñango CL, Pepper DS. Studies of a fibrinolytic enzyme from the larvae of *Lonomia achelous* (Cramer) using chromogenic peptide substrates. *Thromb Haemost.* 1981; Dec 23; 46(4): 710-3.

Arocha-Piñango CL, de Bosch NB, Nouel A, Torres A, Perales J, Alonso ME, Rodrigues S, Carvajal W. Fibrinolytic and procoagulant agents from Saturnidae moth caterpillar. *Haemost and Animal Venoms* 1988; 223-240.

Arocha-Piñango CL, de Bosch NB, Nouel A, Torres A, Goldstein C, Nouel A, et al. Six new cases of a caterpillar- induced bleeding syndrome. *Thromb Haemst* 1992; 67: 402-07.

Arocha-Piñango CL, Guerrero B. *Lonomia* genus caterpillar toxins: Biochemical aspects. *Biochimie* 2000; 82: 937-42.

Arocha-Piñango CL, Guerrero B. *Lonomia* genus caterpillar envenomation: Clinical and Biological Aspects. *Haemostasis* 2001; 31: 288-93.

Arocha-Piñango CL, Perales JE, Gorzula S. Agentes fibrinolíticos en los líquidos biológicos de una oruga. *Acta Cien Ven* 1977; 28: 284-9.

Brasil. Ministério da Saúde. Acidentes por lepdópteros. In: Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Brasília (DF); 1998.131p.

Bredt DS, Snyder SH. NITRIC OXIDE: a physiologic messenger molecule. *Annu. Rev. Biochem.* 1994; 63: 175-95.

Colman RW, Marder VJ, Salzman EW, Hirsh J. Overview of Hemostasis. In: *Haemostasis and thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. 3⁰ ed. Philadelphia, J. B. Lippincott Company; 1994. p. 3-16.

Dias da Silva W, Campos ACMR, Gonçalves LRC, Sousa e Silva MCC, Higashi HG, Yamagushi I.K, Kelen EMA. Development a specific antivenom against toxins of *Lonomia obliqua* caterpillars. *Toxicon* 1996; 34(9): 1045-49.

Dibella EE, Maurer MC, Scheraga HA. Expression and folding of recombinant bovine Prethrombin-2 and its activation to thrombin. *J. Biol. Chem.* 1995; 270 (1): 163-9.

DiScipio RG, Henderson MA, Yates SG, Davie EW. A comparison of human prothrombin, factor IX (Christmas factor), factor X (Stuart factor) and protein S. *Biochemistry* 1977; 16:698-706.

Donato JL, Moreno RA, Hyslop S, Duarte A, Antunes E, Le Bonniec BF, et al. *Lonomia obliqua* caterpillar spicules trigger human blood coagulation via activation of Factor X and prothrombin. *Thromb Haemost* 1998; Mar;79(3):539-42.

Duarte AC, Caovilla J, Lorini I, Lorini D, Mantovani G, Sumida J, et al. Insuficiência renal aguda por acidente com lagartas. *Nefrologia*, 1990; 12: 184-7.

Duarte AC, Crusius PS, Pires CA, Schilling MA, Fan HW. Intracerebral haemorrhage after contact with *Lonomia* caterpillars. *Lancet* 1996; Oct 12; 348(9033): 1033.

Duarte AC, Walter G, Barros E. *Lonomia obliqua*. Acidentes com Animais Peçonhentos: consulta rápida. Serviço de eventos do Hospital das Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, 1997; 207: 163-8.

Fan WH. Ensaio clínico em três fases para avaliação de um antiveneno específico no tratamento da Síndrome Hemorrágica causada por lagartas do gênero *Lonomia* [Tese de Doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2002.

Flower DR. Multiple molecular recognition properties of the lipocalin protein family. J. Mol. Recogn 1995; 8: 185-95.

Flower DR. The lipocalin protein family: structure and function. Biochem. J., 1996; 318: 1-14.

Flower DR, North ACT, Sansom CE. The lipocalin protein family: structural and sequence overview. Biochimica et Biophysica Acta, 2000: 1482: 9-24.

Fraiha H, Ballarini AJ, Leão RNQ, Costa JRD, Dias LB. Síndrome hemorrágica por contato com larvas de mariposa (Lepidoptera, Saturnidae). In: Instituto Evandro Chagas: 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical. Belém: Fundação Serviços de Saúde Pública; 1986. p. 811-20.

Francischetti IM, Ribeiro JM, Champagne D, Andersen J. Purification, cloning, expression and mechanism of action of a novel platelet aggregation inhibitor from the salivary gland of the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. J. Biol. Chem. 2000; 275: 12639-50.

Fuentes-Prior P, Noeske-Jungblut C, Donner P, Schleuning WD, Huber R, Bode W. Structure of the thrombin complex with triabin, a lipocalin-like exosite-binding inhibitor derived from a triatomine bug. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 11845-50.

Fujikawa K, Coan MH, Legaz ME, Davie EW. The mechanism of activation of bovine factor X (Stuart factor) by intrinsic and extrinsic pathways. Biochemistry 1974; 13: 5290-9.

Fujikawa K, Titani K, Davie EW. Activation of bovine factor X (Stuart factor): conversion of activation of factor X α to factor X β . Proc Natl Acad Sci USA 1975; 72: 3359-63.

- Guerrero BAG, Arocha-Piñango CL. Activation of human prothombin by the venom of *Lonomia achelous* (Cramer) caterpillars. *Thomb Res.* 1992; 66: 169-77.
- Guerrero BAG, Arocha-Piñango CL, San Juan AG. *Lonomia achelous* caterpillar venom (LACV) selectively inactivates blood clotting factor XIII. *Thromb. Res.* 1997a; 87: 83-93.
- Guerrero BAG, Arocha-Piñango CL, San Juan AG. Degradation of human factor XIII by Lonomin V, a purified fraction of *Lonomia achelous* caterpillar venom. *Thromb Res.* 1997b; 87: 171-81.
- Hellman K, Hawkins RI. Prolixin-S and prolixin-G: two anticoagulants from *Rhodnius prolixus* STAHL. *Nature*, 1965; 207: 265-8.
- Jesty J, Nemerson Y. Purification of Factor VII from bovine plasma. Reaction with tissue factor and activation of Factor X. *J Biol Chem.* 1974; Jan 25; 249(2): 509-15.
- Kelen EMA, Picarelli ZP, Duarte AC. Hemorrhagic syndrome induced by contact with caterpillar of the genus *Lonomia* (Saturnidae, Hemileucinae). *J Toxinol Toxin Rev* 1995; 14(3): 283-308.
- Keller PM, Waxman L, Arnold BA, Schultz LD, Condra C, Connolly TM. Cloning of the cDNA and expression of moubatin, an inhibitor of platelet aggregation. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 5450-6.
- Lemaire C. Descriptions d'Attacidae nouveaux d'Amérique Centrale et du Sud. (Lep.). I. Descriptions préliminaires de 16 espèces nouvelles du genre *Lonomia* Walker. *Bull. Soc. Entomol. France*, 1972a.; 76: 197-205.
- Lemaire C. Revision du genre *Lonomia* Walker, Lep., Attacidae. *Ann. Soc. Entomol. France*, 1972b; 8: 767-861.
- Levy JH. The human inflammatory response. *J. Cardiovasc. Pharmacol*, 1996; 27 (Suppl 1): S31-37.

Lorini LM. Taturana aspectos biológicos e morfológicos da *Lonomia obliqua*. Passo Fundo: EDIUPF, 1999. p. 64

Lorini LM, Corseuil E. Aspectos morfológicos de *Lonomia obliqua* Walker (Lepidoptera: Saturniidae). Neotropical Entomology 2001; 30(3): 373-8.

Mann KG. Prothrombin and thrombin. In: Colman, R.W.; Marder, V.J.; Salzman, E.W.; Hirsh, J. Haemostasis and thrombosis: Basic principles and clinical practice. 3^o ed. Philadelphia, J. B. Lippincott Company: 1994. p. 184-196.

Mannaioni PF, Bello MGD, Masini E. Platelets and inflammation: role of platelet-derived growth factor, adhesion molecules and histamine. Inflamm Res., 1997; 46: 4-18.

Mannucci PM. Hemostatic drugs. N Engl J Med. 1998; Jul 23; 339(4): 245-53.

Marques LAM. Estudo imunoquímico do veneno da lagarta *Lonomia obliqua* e desenvolvimento de um ELISA (“Enzyme-linked immunosorbent assay”) para detecção do veneno. [Dissertação de Mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 1999.

McGee MP, Li LC. Functional difference between intrinsic and extrinsic coagulation pathways. Kinetics of factor X activation on human monocytes and alveolar macrophages. J Biol Chem. 1991; May 5; 266(13): 8079-85.

Montfort WR, Weichsel A, Andersen JF. Nitrophorins and related antihemostatic lipocalins from *Rhodnius prolixus* and other blood-sucking arthropods. Biochim Biophys Acta 2000; Oct 18; 1482(1-2): 110-8.

Nelsestuen GL. Role of gamma-carboxyglutamic acid. An unusual protein transition required for the calcium-dependent binding of prothrombin to phospholipid. J Biol Chem. 1976; Sep 25; 251(18): 5648-56.

Nelsestuen GL, Broderius M, Martin G. Role of γ -carboxyglutamic acid. Cation specificity of prothrombin and factorX-phospholipid binding. J.Biol. Chem 1976; 251: 6886-93.

Nesheim ME, Kettner C, Shaw E, Mann KG. Cofactor dependence of factor Xa incorporation into the prothrombinase complex. *J Biol Chem* 1981; 256: 6537-40

Paesen GC, Adams PL, Harlos K, Nuttall PA, Stuart DI. Tick histamine-binding proteins: isolation cloning and three-dimensional structure. *Mol Cell* 1999; 3: 661-71.

Reis CV, Portaro FC, Andrade SA, Fritzen M., Fernandes BL, Sampaio CA, et al. A prothrombin activator serine protease from the *Lonomia obliqua* caterpillar venom (LOPAP) biochemical characterization. *Thromb. Res.* 2001a; Jun 1:102(5): 427-36.

Reis CV, Farsky SH, Fernandes BL, Santoro ML, Oliva ML, Mariano M, et al. *In vivo* characterization of LOPAP, a prothrombin activator serine protease from the *Lonomia obliqua* caterpillar venom. *Thromb. Res.* 2001b; Jun 1: 102(5): 437-43.

Ribeiro JM, Nussenzveig RH. Nitric oxide synthase activity from a hematophagous insect salivary gland. *FEBS Lett.* 1993; 330: 165-68.

Ribeiro JMC, Schneider M, Guimaraes JA. Purification and characterization of prolixin S (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Biochem. J.* 1995; 308: 243-9.

Ribeiro JMC, Walker FA. High affinity histamine-binding and antihistaminic activity of the salivary nitric oxide carrying heme protein (nitrophorin) of *Rhodnius prolixus*. *J. Exp. Med.* 1994; 180: 2251-7.

Rocha-Campos AC, Goncalves LR, Higashi HG, Yamagushi IK, Fernandes I, Oliveira JE, et al. Specific heterologous F(ab')₂ antibodies revert blood incoagulability resulting from envenoming by *Lonomia obliqua* caterpillars. *Am J Trop Med Hyg* 2001; May-Jun; 64(5-6): 283-9.

Rosing J, Tans G. Inventory of exogenous prothrombin activators. *Thromb. Haemost.* 1991; 65(5): 627-30.

Saito H. Purification and properties of two blue biliproteins from the larval hemolymph and integument of *Rhodinia fugax* (Lepidoptera: Saturniidae). *Insect Biochem Mol Biol*. 1998; Dec; 28(12): 995-1005.

Sanchez D, Ganfornina MD, Gutierrez G, Marin A. Exon-intron structure and evolution of the lipocalin gene family. *Mol. Biol. Evolut*. 2003; 20: 775.

Schmidt HH, Walter U. NO at work. *Cell* 1994; 78: 919-25.

Stern DM, Drillings M, Nossel HL, Hurler-Jensen A, LaGamma KS, Owen J. Binding of factors IX and IXa to cultured vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; Jul; 80(13): 4119-23.

Stern DM, Nawroth PP, Kisiel W, Vehar G, Esmon CT. The binding of factor IXa to cultured bovine aortic endothelial cells. Induction of a specific site in the presence of factors VIII and X. *J Biol Chem*. 1985; Jun 10; 260(11): 6717-22.

Sun J, Yamaguchi M, Yuda M, Miura K, Takeya H, Hirai M, et al. Purification, characterization and cDNA cloning of a novel anticoagulant of the intrinsic pathway (prolixin-S) from salivary glands of the blood sucking bug. *Thromb. Haemost.* 1996; 75: 573-7.

Tracey PB, Nesheim ME, Man KG. Coordinate binding of factor Va and factor Xa to the unstimulated platelets. *J. Biol. Chem*. 1981; 256: 743-51.

Tracey PB, Eide LL, Man KG. Human prothrombinase complex assembly and function on isolated peripheral blood cell populations. *J. Biol. Chem*. 1985; 260: 2119-24.

Yamanaka A, Ito T, Koga D, Sato T, Ochiai M, Endo K. Purification and characterization of biliverdin-binding protein from larval hemolymph of the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus* L. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000; Sep; 64(9): 1978-81.

van Diejen G, Tans G, Rosing J, Hemker HC. The role of phospholipid and FVIIIa in the activation of bovine factor X. *J. Biol. Chem*. 1981; 256: 3433-42.

Verstraete M. Clinical application of inhibitors of fibrinolysis. *Drugs* 1985; Mar; 29(3): 236-61.

Zanim M, Lourenço DM, Motta G, Dalla Costa LR, Grando M, Gamborgi GP, et al. Blood coagulation and fibrinolytic factors in 105 patients with hemorrhagic syndrome caused by accidental contact with *Lonomia obliqua* caterpillar in Santa Catarina, Southern Brazil. *Thromb Haemost* 2003; Feb; 89(2): 355-64.

Zhang Y, Ribeiro JM, Guimaraes JA, Walsh PN. Nitrophorin-2: a novel mixed-type reversible specific inhibitor of the intrinsic factor-X activating complex. *Biochemistry* 1998; 37: 10681-90.

Weichsel A, Andersen JF, Champagne DE, Walker FA, Montfort WR. Crystal structures of a nitric oxide transport protein from a blood-sucking insect. *Nat. Struct. Biol.* 1998; 5: 304-9.